

RNAi 技术在昆虫学中的研究进展及展望*

田宏刚¹ 张文庆^{2**}

(1. 西北农林科技大学应用昆虫学重点实验室 杨凌 712100;

2. 中山大学有害生物控制与资源利用国家重点实验室 广州 510275)

摘要 在昆虫中, RNAi 是一种对抗外源病毒的自然免疫方式, 基于生物体中的这种内在机制而建立的 RNAi 技术已经被广泛用来研究多种昆虫基因的功能。近年的研究表明 RNAi 技术在抵御害虫和防治益虫疾病方面具有潜在的应用价值, 有可能对农业有害生物的控制起到巨大的推动作用。本文综述了 RNAi 与昆虫免疫、及其在昆虫基因功能研究、害虫控制、益虫疾病控制和昆虫系统生物学方面的最新研究进展, 并展望了 RNAi 在昆虫学研究中的发展趋势。

关键词 RNAi, 昆虫, 基因功能, 害虫控制

Advances and prospects of RNAi technology in entomology

TIAN Hong-Gang¹ ZHANG Wen-Qing^{2**}

(1. Key Laboratory of Applied Entomology, Northwest A&F University, Yangling 712100, China;

2. State Key Laboratory of Biocontrol, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract RNAi has been recognized as an innate immune mechanism against extracellular viruses, based on this biological mechanism, RNAi technology has been established in insects and used widely to investigate kinds of insects' gene functions. In the past years, researchers have found that RNAi has a potential use against insect pests and control beneficial insects' disease, and which may will provide a huge boost for agricultural pest control. We reviewed recent advances focusing on RNAi and insect immunology, as well as its use in gene function study, insect pest control, beneficial insects' disease control along with the insect system biology, we also prospect the future development of RNAi applied in entomology.

Key words RNAi, insect, gene function, insect pest control

转录后基因沉默现象 (post transcriptional gene silencing, PTGS) 是最初在植物中被发现的 (Napoli *et al.*, 1990), 但是导致基因沉默的真正原因——由 dsRNA (double-strand RNA) 介导产生的 RNAi 现象直到 1998 年才在线虫 *Caenorhabditis elegans* 中得以阐明 (Fire *et al.*, 1998)。现已在真菌、植物、线虫、昆虫、小鼠等许多真核生物体内都发现了这种现象, 目前的研究认为 RNAi 是生物进化过程中保留下来的一种抵抗病毒侵入 (viral invasion)、转座子扩展 (transposon expansion) 和对基因表达的转录后调节的强有力机制 (Buckingham *et al.*, 2004; Tijsterman *et al.*,

2004)。由于 RNAi 诱导基因沉默的特异性和高效性, 特别是在非模式生物之中操作的简便性, 现已广泛的用于多种生物的基因功能研究之中, 而且在基于 RNAi 技术的有害生物控制和疾病医疗方面也都展现出良好的应用前景 (Auer and Frederick, 2009; Perrimon *et al.*, 2010)。

在昆虫学研究中, 现在已经采用注射、饲喂导入 dsRNA 或 siRNA (small interfering RNA) 的方法在多种昆虫之中发现可以诱导 RNAi 的产生 (Terenius *et al.*, 2011)。这些昆虫包括鞘翅目、鳞翅目、膜翅目、双翅目和直翅目等种类的昆虫, 而且研究还发现在大多数昆虫之中 RNAi 是系统性

* 资助项目: 国家自然科学基金 (31101432)、西北农林科技大学博士科研启动基金 (2010BSJJ064)。

** 通讯作者, E-mail: lsszwq@mail.sysu.edu.cn

收稿日期: 2011-12-05, 接受日期: 2011-12-20

的,在某些昆虫如赤拟谷盗 *Tribolium castaeum* 和蟋蟀 *Gryllus bimaculatus* 之中还发现,对亲本实施 RNAi 在其子代中仍可观察到基因沉默现象 (Bucher *et al.*, 2002; Ronco *et al.*, 2008)。随着研究的深入和多种昆虫基因组序列的公布,利用 RNAi 方法对单个基因功能的分析已发展到对多个基因乃至整个基因组水平基因功能的研究之中。近年来,利用 RNAi 介导的转基因植物控制害虫,以及在野外控制益虫病害的研究方面亦有了成功的报道 (Baum *et al.*, 2007; Mao *et al.*, 2007; Hunter *et al.*, 2010; Mao *et al.*, 2010)。本文重点就 RNAi 与昆虫免疫和 RNAi 技术在昆虫学中的应用,以及 RNAi 在昆虫系统生物学研究中的最新进展进行综述。

1 RNAi 与昆虫免疫

RNAi 一般由 dsRNA 介导,然后被细胞内一种称之为 Dicer 的酶切割成 21 ~ 25 nt 的 siRNA, siRNA 与 RISC (RNA-induced silencing complex) 结合,在 ATP 供能的情况下,寻找到与 siRNA 序列互补的靶 mRNA 进行切割,使其降解,最终达到了降低 mRNA 表达水平的作用。现在的研究发现,导致靶标基因沉默的小分子 RNA 除了 siRNA 以外,还有 miRNA (microRNA) 和 endo-siRNA (endogenous small interfering RNAs) (Okamura and Lai, 2008; Ulvila *et al.*, 2010; Yamaguchi *et al.*, 2011)。

在昆虫基因功能研究中,导入虫体的长链 dsRNA 进入细胞内即会被 Dicer 切割成许多小片段的 siRNA,而这些 siRNA 除了会与互补 mRNA 结合外,还有一些 siRNA 可能会与某些非靶标基因结合,即导致非靶标基因沉默而产生脱靶效应 (off-target effects, OTEs) (Seinen *et al.*, 2010)。在果蝇 *Drosophila melanogaster* 之中的研究发现 RNAi 筛选时 dsRNA 设计不恰当会产生许多 OTEs,而且当 siRNA 分子中有大于 19 以上的碱基与非靶标基因互补时,那么 OTEs 的几率则会快速增加 (Kulkarni *et al.*, 2006; Ma *et al.*, 2006)。由此可以看出,OTEs 对于我们通过 RNAi 来鉴定基因功能会有较大的影响,所以设计合适的 dsRNA 以避免 OTEs 的产生对我们得到准确的实验结果显得尤为重要。Seinen (2010) 和 Booker (2011) 通过对果蝇进行生物信息学分析,发现针对基因不

同区域设计 dsRNA 可以有效避免 OTEs 的产生,这将会为我们在其它昆虫中实施 RNAi 起到一定的参考作用,有助于我们在研究中得到较准确的结果。

我们知道昆虫为天然免疫系统,包括体液免疫和细胞免疫 2 种方式,主要用来攻击、消灭入侵病原体,从而为昆虫的发育提供保障 (王英和黄复生, 2008)。RNAi 作为基因功能研究的重要工具,研究发现其也是昆虫抵抗外源病毒的一种重要的天然免疫反应,主要包括 siRNA 和 miRNA 介导的 2 种方式。siRNA 介导方式主要是由外源病毒进入生物体细胞内以后,以病毒作为模板合成与病毒 RNA 相对应的 dsRNA,然后进入到 RNAi 途径被 Dicer 切割成 siRNA,并使 RNAi 信号在入侵外细胞间传递,从而导致病毒 RNA 的降解以起到抵御病毒的影响。例如 Dicer 基因突变的果蝇与其野生型相比对病毒的感染能力更为敏感,且随着病毒滴度的提高其死亡率也逐渐增加 (Galiana-Arnoux *et al.*, 2006)。这即说明了 RNAi 参与了抵抗病毒的免疫反应。研究还发现细胞内源性的 miRNA 也参与了维护和调节免疫反应的过程,其作用方式与 siRNA 的抗病毒方式相似。RNAi 抵抗病毒的功能在植物中最初发现,但是目前的研究表明在昆虫、线虫和哺乳动物细胞中这种抵抗病毒的天然免疫方式亦广泛存在,是一种古老的抵抗外源核酸的保护机制 (Berkhout and Haasnoot, 2006; Ulvila *et al.*, 2010; Blair, 2011; Siu *et al.*, 2011)。在这些生物体中,正是由于这种免疫机制的存在,才使我们通过 RNAi 对生物基因功能的研究成为现实。

2 RNAi 在昆虫学研究中的应用

2.1 基因功能研究

RNAi 技术自发现以来,已在昆虫学研究中取得了广泛的应用。例如在美国国家医学图书馆的 PubMed 文献检索系统中以 RNAi 和 insect 为关键词检索,可以发现与昆虫 RNAi 研究相关的文献已近 1 400 余篇。由此可见,自从 1998 年首次应用 RNAi 技术在果蝇胚胎中研究 *frizzled* 和 *frizzled2* 在 Wingless 途径中的基因功能以来 (Kennerdell and Carthew, 1998), RNAi 技术已经成为现代昆虫学基因功能研究之中一项被广泛采用的方法。

在昆虫中主要通过将 dsRNA 或 siRNA 分子

导入到昆虫细胞或活体昆虫内来实施 RNAi。对于昆虫细胞而言,可采用将其浸泡在 dsRNA 溶液中的方法来进行研究(Rogers *et al.*, 2002)。而对活体昆虫的研究,主要采用注射法和饲喂法 2 种。注射 RNAi 由于其相对简便高效,已在包括鞘翅目、鳞翅目、膜翅目、双翅目、半翅目、直翅目、蜚蠊目等多个种类的昆虫中成功应用。作者实验室利用注射法 RNAi 研究了甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* 几丁质合成通路中的相关基因 *SeCHSA*、*SeTPS*、*SeTre-1*、*SeTre-2* 和 *SeEcR* 的功能,明确了上述基因在甜菜夜蛾几丁质合成和蜕皮发育中的作用,为深入理解几丁质合成中的关键基因及筛选具有害虫控制潜力的候选基因提供了理论基础(Chen *et al.*, 2008, 2010; Tang *et al.*, 2010; Yao *et al.*, 2010)。

注射 RNAi 的方法虽然具有操作简便,效率较高的特点,但是对于某些微小昆虫往往会导致较高的虫体死亡率,且技术要求颇高,因此研究人员在此基础上又发展出了饲喂 dsRNA 的方法。通过饲喂 RNAi 的方法于 2006 年首先用来研究长红烈蝽 *Rhodnius prolixus* 基因 *NP2* 和苹果透翅蛾 *Epiphyas postvittana* 的 *EposCXE1* 基因,研究发现通过饲喂 dsRNA 降低了靶标基因转录水平,这说明可以采用饲喂 RNAi 方法研究昆虫的基因功能(Araujo *et al.*, 2006; Turner *et al.*, 2006)。饲喂 RNAi 一般是通过将试剂盒合成的 dsRNA 加入试验昆虫的饲料中来实施研究的,但是由于饲喂法与注射法相比其基因沉默的效率较低,所以一般需要较大量的 dsRNA,这就将带来研究成本的增加。作者实验室在此基础上发展出了利用大肠杆菌表达 dsRNA 方法来饲喂甜菜夜蛾,研究发现连续取食 dsRNA 后几丁质合成酶基因 *SeCHSA* 的表达受到了抑制,且昆虫的蜕皮发育也受到了阻碍(Tian *et al.*, 2009)。现在采用饲喂大肠杆菌表达 dsRNA 的方法研究相关基因的功能在棉铃虫 *Helicoverpa armigera*、桔小食蝇 *Bactrocera dorsalis* 和马铃薯甲虫 *Leptinotarsa decemlineata* 中也已有成功的报道(Hou *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2011; Zhu *et al.*, 2011)。而现在采用饲喂 RNAi 的方法对基因功能的研究在其它类的昆虫诸如玉米根萤叶甲 *Diabrotica virgifera virgifera*、双蟋蟀 *Gryllus bimaculatus*、小菜蛾 *Plutella xylostella*、欧洲玉米螟 *Ostrinia nubilalis*、褐飞虱

Nilaparvata lugens、散白蚁 *Reticulitermes flavipes*、意蜂 *Apis mellifera* 和冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae* 等多种昆虫中也已被证实可行(Baum *et al.*, 2007; Meyering-Vos and Muller, 2007; Zhou *et al.*, 2008; Bautista *et al.*, 2009; Francis and Zilo, 2009; Hunter *et al.*, 2010; Khajuria *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2010)。饲喂法的应用不仅为一些难于采用注射 RNAi 研究的昆虫提供了可供选择的方法,更重要的是通过饲喂 RNAi 的方法可以筛选到一些可用于害虫控制的候选基因资源,这将会为害虫的可持续治理提供重要的保障。

在昆虫 RNAi 的研究过程中,由于 dsRNA 不会诱导产生类似于哺乳动物中的干扰素效应(inteferon response),所以目前发表的绝大多数论文中主要是以 dsRNA 在昆虫中开展研究工作(Bridge *et al.*, 2003)。且由于 siRNA 的合成费用相对较高,因此以 siRNA 进行的研究工作只有极少的报道。但是最近日本研究者 Yamaguchi 等(2011)在家蚕 *Bombyx mori* 胚胎中实验发现,与 dsRNA 相比 siRNA 诱导的 RNAi 效果更佳。这即研究说明,在昆虫中直接采用 siRNA 不仅会诱导基因沉默,而且对于一些直接采用 dsRNA 较难诱导 RNAi 产生的昆虫和基因来说,采用导入 siRNA 的方法不失为一个较好的选择。

在果蝇中,研究人员采用 Gal4-UAS 系统在果蝇体内表达 dsRNA 的方法诱导 RNAi,这种方法可以在果蝇的多个组织中有效诱导可持续性 RNAi 产生,并且可在多个世代中观察到有效的基因沉默(Miller *et al.*, 2008)。由于此方法的有效性,果蝇中多个基因的功能已被解析,并且在美国哈佛医学院建立了果蝇 RNAi 筛选中心(*Drosophila* RNAi screening center, DRSC),现在果蝇中正利用 RNAi 对其整个基因网络调控及系统生物学开展相关研究工作(Doumanis *et al.*, 2009; Saleh *et al.*, 2009; Perrimon *et al.*, 2010; Choo *et al.*, 2011)。

昆虫 RNAi 研究一般是通过检测靶标基因的沉默水平和分析相应生物表型来研究其相应基因功能,但是由于每个基因在生物体中具体功能的差异,并非每个基因的沉默均能导致可见的表型。例如在长红烈蝽 *Rhodnius prolixus* 之中通过喂食针对唾液腺 *NP2* 基因的 dsRNA 有效降低了靶标基因的表达水平,然而却没有产生可见的表型

(Araujo *et al.*, 2006)。通过注射 RNAi 对家蚕 *pgFAR*、*pgACBP* 和 *PBANR* 等信息素生物合成途径中的相关基因的抑制并没有对蛹的发育和成虫羽化产生任何影响,然而信息素的生物合成却受到了抑制(Ohnishi *et al.*, 2006)。这就说明,并不是所有基因的沉默均会导致可见表型的产生,我们必须依据所研究基因的具体功能进行具体分析,不能以表型作为判断 RNAi 实验成功与否的绝对标准。

2.2 害虫控制研究

自从 2007 年中国和美国的研究人员在 *Nature Biotechnology* 杂志上发表的 2 篇独立研究报告表明,通过 RNAi 介导的转基因植物有可能用于害虫控制,基于 RNAi 技术在害虫控制中的研究就已成为昆虫学中的热门领域(Baum *et al.*, 2007, 2010)。这两个研究小组均首先通过对候选基因进行筛选并选择合适的目标基因,再通过转基因植物表达相应 dsRNA 并确保目标害虫取食 dsRNA 的量达到诱导 RNAi 的要求,这两项措施为研究的成功提供了重要的保障。其研究结果也同时说明,通过 RNAi 介导的转基因植物控制害虫具有极大的潜力。

最近在半翅目昆虫褐飞虱和桃蚜 *Myzus persicae* 中的研究结果更加使我们相信 RNAi 介导的转基因植物在控制害虫中的潜力。Zha 等(2011)通过水稻表达 *NLHT1*、*Mlcar* 和 *Nltry* 基因的 dsRNA 饲喂褐飞虱若虫,结果发现降低了中肠内靶标基因的转录水平,但是并没有观察到死亡表型。作者实验室在水稻中表达褐飞虱蜕皮激素受体基因的 dsRNA,饲喂褐飞虱若虫后发现其存活率虽然还有 90% 左右,但后代若虫数却减少了约 30% ~ 60% (未发表)。Pitino 等(2011)通过对桃蚜饲喂表达肠道基因 *Rack1* 和唾腺基因 *MpC002* dsRNA 的转基因烟草和拟南芥,研究发现目标基因的表达被抑制达 60% 以上,而且目标基因被抑制的桃蚜所产的后代数量更少。这些研究均表明,要通过 RNAi 介导的植物控制害虫,筛选合适的靶标基因是成功的关键。目前的第二代高通量测序技术可以从 mRNA 直接获得相应 cDNA 序列信息,这就使得对单个物种特别是非模式生物整个转录组和基因组的分析成为可能。利用此技术可以大规模的筛选用于 RNAi 植物进行害虫

控制的候选基因,这将极大的拓展目标抗虫基因资源(Wang *et al.*, 2011)。

上述研究结果使我们相信,通过 RNAi 介导的转基因植物在大田中控制害虫极有可能成为现实,就如转 Bt 基因抗虫植物的广泛应用一样。但是就像转 Bt 基因植物存在的风险一样,对 RNAi 转基因抗虫植物也必须进行相应的风险评估。例如在模式植物烟草和拟南芥中存在的 RNAi 植物抗虫机制是否与目标农作物中相同,是否有关键的差异和潜在的风险,这些问题目前都还没有进行研究。虽然理论分析表明, RNAi 植物与转 Bt 基因植物不同,因为它不会产生有毒蛋白,而且在植物中小分子 RNA 的量相对比较少,这些都会使我们得出 RNAi 抗虫植物风险较低的结论。但是小分子 RNA 在极低浓度下非常活跃,而且有研究表明保存在滤纸上血液中的胞外 RNA 可以在 32℃ 下保存达 3 月之久。而且转入的基因还有可能产生 OTEs 和对非靶标生物造成一定的影响,特别是对人类健康可能产生某些潜在风险,这提醒我们也不能对 RNAi 抗虫植物的风险掉以轻心,必须谨慎对待,对 RNAi 抗虫植物提供科学的安全评价(Auer and Frederick, 2009)。

2.3 益虫疾病控制

以前昆虫 RNAi 的研究主要集中在昆虫基因功能的解析和害虫控制的研究之中,最近的研究显示 RNAi 还可用于在野外控制益虫的病害,这又进一步拓展了 RNAi 在昆虫学研究中应用范围。我们知道蜜蜂是昆虫世界中非常重要的有益昆虫,对于世界经济具有独特的贡献,它不仅给人类带来香甜的蜂蜜,更主要是通过给植物授粉的方式为全世界带来了近 30% 食品产量提升。可近年来由于受到 CCD (Colony Collapse Disorder) 疾病的困扰,蜜蜂的生产遇到了严重的挑战,目前的研究认为 CCD 可能是由一种 IAPV (Israeli acute paralysis virus) 病毒引起,虽然这种病毒并未在所有诊断患有 CCD 疾病的蜂群中发现,但是研究发现 IAPV 会导致蜜蜂的死亡。实验室内的研究证明,通过饲喂意蜂 *Apis mellifera* IAPV dsRNA 的方式可以有效抑制目标基因的表达(Maori *et al.*, 2009)。最近 Hunter 等(2010)通过对意蜂的野外实验发现, IAPV dsRNA 可以阻止蜜蜂自然养殖条件下受 IAPV 干扰而导致的死亡现象。这项研究

分别在美国东北部的宾夕法尼亚州(Pennsylvania)和东南部的佛罗里达州(Florida)独立进行,总共研究包括了 160 个蜂房。这项研究也是利用 RNAi 技术在益虫的真实生态环境中进行病害控制的首次报道,为在真实的生物生存环境下利用 RNAi 控制益虫病害提供了极具价值的探索。

3 RNAi 与昆虫系统生物学

系统生物学的目标是致力于阐明细胞和生物体内基因与蛋白水平之间相互作用调控的关系,明确在一个生物过程之中相关基因和蛋白所起的作用,以及当生物体受到刺激时细胞行为和反应的内在复杂调控途径。其特点是将生物体内基因和蛋白的功能作用与生物体行为反应联系起来,而不是孤立研究单个基因或蛋白的功能,这将有助于更加准确的理解相关基因和蛋白在生物体中的作用和价值。与经典正向遗传学单基因分析技术相比, RNAi 介导的反向遗传学研究方法结合基因组学研究技术为大规模基因功能和系统生物学的研究提供了更加有力的支持(Kohl *et al.*, 2010; Neumüller and Perrimon, 2011)。

近些年,果蝇已经成为在系统基因组范围内利用 RNAi 技术进行大规模基因功能研究的优势系统。采用 RNAi 技术可以将果蝇特定的表型与相关基因或基因类群联系起来,同时再结合蛋白与蛋白之间相互作用研究的数据,可以阐明某一类特定表型下的调控网络并提供一个遗传框架,进一步的生化分析将有可能揭示表型下隐藏的分子机制。为了系统的研究果蝇特定细胞型的内基因功能,研究人员构建了大量果蝇转基因 RNAi 系,主要有 VDRC (Vienna *Drosophila* RNAi Collection) 目前拥有 13 327 个, NIG-FLY (National Institute of Genetics-FLY) 保存有 6 000 个,此外 TRIP (transgenic RNAi project) 保存了 2 034 个。这些果蝇 RNAi 系均基于 Gal4-UAS 系统在特定发育时期和组织中诱导 RNAi 的表达(Dietzl *et al.*, 2007; Ni *et al.*, 2009)。当然,由前文中的概述我们已经知道利用 RNAi 大规模研究基因功能时有可能导致 OTEs, 仅依靠生物信息学的分析还是不准确的,我们还必须以最终的 RNAi 表型作为确认的依据。果蝇作为昆虫中研究最为深入的模式物种,通过 RNAi 对果蝇系统生物学的分析,并伴随现代生物技术的快速发展,在果蝇中获取的信

息资源将有助于我们对其它种类昆虫相关基因和基因组学的研究,这必将极大促进整个昆虫系统生物学的发展。

4 展望

RNAi 技术从诞生起就吸引了昆虫学研究者高度关注的目光,现已成为当代昆虫学特别是昆虫基因功能研究方面的热门工具,在多种昆虫中均有了成功的应用。但是从目前报道的研究结果可以看出,虽然 RNAi 的作用机理基本相似,但是不同昆虫中 RNAi 的效果却存在较大的差异。因此我们建议在后续的研究中要重点就 RNAi 信号在昆虫体内传递的途径以及不同种类昆虫中 RNAi 差异的机制进行深入的研究。这不仅有助于我们更深入的理解不同昆虫 RNAi 的作用方式,而且有可能会对提高那些不易诱导 RNAi 昆虫的效率提供一定的帮助。

第二代基因测序技术的发展为我们获取大规模的基因信息提供了有力的技术保障,同样我们对于昆虫 RNAi 的研究也要从对单个基因的功能分析尽快发展到对多个基因的功能研究之中,这将会极大的促进昆虫基因功能的解析,而且也会为 RNAi 抗虫植物提供有价值的基因资源。但也要意识到 OTEs 现象对 RNAi 结果的影响,要尽量按照目前已知的一些规则去设计 dsRNA 或 siRNA,以期能够较准确的分析研究结果。

通过 RNAi 介导的转基因植物在害虫控制方面展现了巨大的应用潜力,但是我们也要看到目前的研究主要是在实验室内进行,还缺乏田间实验的有效数据,而且还有许多研究是在模式植物烟草和拟南芥中开展的,仍比较欠缺以害虫目标农作物为 RNAi 抗虫植物进行的研究。所以我们建议在后续的研究中要更多的以害虫目标农作物进行研究,并尽可能开展田间实验工作,同时将 RNAi 植物的抗虫效果与已有的转基因植物例如转 Bt 基因植物抗虫效果进行比较分析,以期 RNAi 抗虫转基因植物的早日应用奠定坚实的基础。当然,同其它转基因植物一样, RNAi 转基因植物也需要做相应的风险评估,以确保对非靶标生物的安全性。

RNAi 作为昆虫抵抗外源病毒的一种免疫机制,可以利用这个特性进一步拓展其在益虫病害特别是病毒病防治方面的研究,为益虫如蜜蜂、家

蚕等健康饲养提供技术保障。作为一项快速发展并取得广泛应用的技术, RNAi 在昆虫学研究中展示了广阔的用途, 我们相信随着对昆虫 RNAi 信号传递机制进一步的了解以及 RNAi 技术更广泛的应用, 必将会对深入了解昆虫相关基因功能及其基因网络调控提供更具价值的信息, 进一步推动非模式昆虫系统生物学的快速发展, 同时也会为 RNAi 技术应用于大田害虫控制和益虫利用方面提供更有效的保障。

参考文献 (References)

- Araujo RN, Santos A, Pinto FS, Gontijo NF, Lehane MJ, Pereira MH, 2006. RNA interference of the salivary gland nitrophorin 2 in the triatomine bug *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae) by dsRNA ingestion or injection. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 36(9):683—693.
- Auer C, Frederick R, 2009. Crop improvement using small RNAs: applications and predictive ecological risk assessments. *Trends Biotechnol.*, 27(11):644—651.
- Baum JA, Bogaert T, Clinton W, Heck GR, Feldmann P, Ilagan O, Johnson S, Plaetinck G, Munyikwa T, Pleau M, Vaughn T, Roberts J, 2007. Control of coleopteran insect pests through RNA interference. *Nat. Biotech.*, 25(11):1322—1326.
- Bautista M, Miyata T, Miura K, Tanaka T, 2009. RNA interference-mediated knockdown of a cytochrome P450, CYP6BG1, from the diamondback moth, *Plutella xylostella*, reduces larval resistance to permethrin. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 39(1):38—46.
- Berkhout B, Haasnoot J, 2006. The interplay between virus infection and the cellular RNA interference machinery. *FEBS Lett.*, 580(12):2896—2902.
- Blair CD, 2011. Mosquito RNAi is the major innate immune pathway controlling arbovirus infection and transmission. *Fut. Microbiol.*, 6(3):265—277.
- Booker M, Samsonova A, Kwon Y, Flockhart I, Mohr S, Perrimon N, 2011. False negative rates in *Drosophila* cell-based RNAi screens: a case study. *BMC Gen.*, 12(1):50.
- Bridge AJ, Pebernard S, Ducraux A, Nicoulaz AL, Iggo R, 2003. Induction of an interferon response by RNAi vectors in mammalian cells. *Nat. Genet.*, 34(3):263—264.
- Bucher G, Scholten J, Klingler M, 2002. Parental RNAi in *Tribolium* (Coleoptera). *Curr. Biol.*, 12(3):R85—R86.
- Buckingham SD, Esmacili B, Wood M, Sattelle DB, 2004. RNA interference: from model organisms towards therapy for neural and neuromuscular disorders. *Hum. Mol. Genet.*, 13(Suppl. 2):R275—R288.
- Chen J, Tang B, Chen H, Yao Q, Huang X, Chen J, Zhang D, Zhang W, 2010. Different functions of the insect soluble and membrane-bound trehalase genes in chitin biosynthesis revealed by RNA interference. *PLoS ONE*, 5(4):e10133.
- Chen X, Tian H, Zou L, Tang B, Hu J, Zhang W, 2008. Disruption of *Spodoptera exigua* larval development by silencing chitin synthase gene A with RNA interference. *Bull. Entomol. Res.*, 98(6):613—619.
- Choo SW, White R, Russell S, 2011. Genome-wide analysis of the binding of the Hox protein ultrabithorax and the Hox cofactor homothorax in *Drosophila*. *PLoS ONE*, 6(4):e14778.
- Dietzl G, Chen D, Schnorrer F, Su KC, Barinova Y, Fellner M, Gasser B, Kinsey K, Oettel S, Scheiblauer S, Couto A, Marra V, Keleman K, Dickson BJ, 2007. A genome-wide transgenic RNAi library for conditional gene inactivation in *Drosophila*. *Nature*, 448(7150):151—156.
- Doumanis J, Wada K, Kino Y, Moore AW, Nukina N, 2009. RNAi screening in *Drosophila* cells identifies new modifiers of mutant huntingtin aggregation. *PLoS ONE*, 4(9):e7275.
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC, 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391(6669):806—811.
- Francis MFN, Zilo LPS, 2009. A non-invasive method for silencing gene transcription in honeybees maintained under natural conditions. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 39(2):157—160.
- Galiana-Arnoux D, Dostert C, Schneemann A, Hoffmann JA, Imler JL, 2006. Essential function *in vivo* for Dicer-2 in host defense against RNA viruses in *Drosophila*. *Nature Immunol.*, 7(6):590—597.
- Hou L, Wang JX, Zhao XF, 2010. *Rab32* and the remodeling of the imaginal midgut in *Helicoverpa armigera*. *Amino Acids*, 40(3):953—961.
- Hunter W, Ellis J, vanEngelsdorp D, Hayes J, Westervelt D, Glick E, Williams M, Sela I, Maori E, Pettis J, Cox-Foster D, Paldi N, 2010. Large-scale field application of RNAi technology reducing Israeli acute paralysis virus disease in honey bees (*Apis mellifera*, Hymenoptera: Apidae). *PLoS Pathog*, 6(12):e1001160.
- Kennerdell JR, Carthew RW, 1998. Use of dsRNA-mediated genetic interference to demonstrate that *frizzled* and *frizzled 2* act in the wingless pathway. *Cell*, 95(7):1017—1026.

- Khajuria C, Buschman LL, Chen MS, Muthukrishnan S, Zhu KY, 2010. A gut-specific chitinase gene essential for regulation of chitin content of peritrophic matrix and growth of *Ostrinia nubilalis* larvae. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 40(8):621—629.
- Kohl P, Crampin EJ, Quinn TA, Noble D, 2010. Systems biology: an approach. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 88(1):25—33.
- Kulkarni MM, Booker M, Silver SJ, Friedman A, Hong P, Perrimon N, Mathey-Prevot B, 2006. Evidence of off-target effects associated with long dsRNAs in *Drosophila melanogaster* cell-based assays. *Nat. Meth.*, 3(10):833—838.
- Li X, Zhang M, Zhang H, 2011. RNA interference of four genes in adult *Bactrocera dorsalis* by feeding their dsRNAs. *PLoS ONE*, 6(3):e17788.
- Liu PC, Wang JX, Song QS, Zhao XF, 2011. The participation of calponin in the cross talk between 20-Hydroxyecdysone and juvenile hormone signaling pathways by phosphorylation variation. *PLoS ONE*, 6(5):e19776.
- Ma Y, Creanga A, Lum L, Beachy PA, 2006. Prevalence of off-target effects in *Drosophila* RNA interference screens. *Nature*, 443(7109):359—363.
- Mao YB, Tao XY, Xue XY, Wang LJ, Chen XY, 2010. Cotton plants expressing *CYP6AE14* double-stranded RNA show enhanced resistance to bollworms. *Transgenic Res.*, 20(3):665—673.
- Mao YB, Cai WJ, Wang JW, Hong GJ, Tao XY, Wang LJ, Huang YP, Chen XY, 2007. Silencing a cotton bollworm P450 monooxygenase gene by plant-mediated RNAi impairs larval tolerance of gossypol. *Nat. Biotech.*, 25(11):1307—1313.
- Maori E, Paldi N, Shafir S, Kalev H, Tsur E, Glick E, Sela I, 2009. IAPV, a bee-affecting virus associated with Colony Collapse Disorder can be silenced by dsRNA ingestion. *Insect Mol. Biol.*, 18(1):55—60.
- Meyering-Vos M, Muller A, 2007. RNA interference suggests sulfakinins as satiety effectors in the cricket *Gryllus bimaculatus*. *J. Insect Physiol.*, 53(8):840—848.
- Miller S, Brown S, Tomoyasu Y, 2008. Larval RNAi in *Drosophila*? *Dev. Gen. Evol.*, 218(9):505—510.
- Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R, 1990. Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. *Plant Cell*, 2(4):279—289.
- Neumüller RA, Perrimon N, 2011. Where gene discovery turns into systems biology: genome-scale RNAi screens in *Drosophila*. *Wires. Syst. Biol. Med.*, 3(4):471—478.
- Ni JQ, Liu LP, Binari R, Hardy R, Shim HS, Cavallaro A, Booker M, Pfeiffer BD, Markstein M, Wang H, Villalta C, Lavery TR, Perkins LA, Perrimon N, 2009. A *Drosophila* resource of transgenic RNAi lines for neurogenetics. *Genetics*, 182(4):1089—1100.
- Ohnishi A, Hull JJ, Matsumoto S, 2006. Targeted disruption of genes in the *Bombyx mori* sex pheromone biosynthetic pathway. *PNAS*, 103(12):4398—4403.
- Okamura K, Lai EC, 2008. Endogenous small interfering RNAs in animals. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 9(9):673—678.
- Perrimon N, Ni JQ, Perkins L, 2010. In vivo RNAi: today and tomorrow. *CSH Perspect. Biol.*, 2(8) doi:10.1101/cshperspect.a003640
- 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.
- Rogers SL, Rogers GC, Sharp DJ, Vale RD, 2002. *Drosophila* EBI is important for proper assembly, dynamics, and positioning of the mitotic spindle. *J. Cell Biol.*, 158(5):873—884.
- Ronco M, Uda T, Mito T, Minelli A, Noji S, Klingler M, 2008. Antenna and all gnathal appendages are similarly transformed by homothorax knock-down in the cricket *Gryllus bimaculatus*. *Dev. Biol.*, 313(1):80—92.
- Saleh MC, Tassetto M, van Rij RP, Goic B, Gausson V, Berry B, Jacquier C, Antoniewski C, Andino R, 2009. Antiviral immunity in *Drosophila* requires systemic RNA interference spread. *Nature*, 458(7236):346—350.
- Seinen E, Burgerhof JGM, Jansen RC, Sibon OCM, 2010. RNAi experiments in *D. melanogaster*: solutions to the overlooked problem of off-targets shared by independent dsRNAs. *PLoS ONE*, 5(10):e13119.
- Siu RWC, Fragkoudis R, Simmonds P, Donald CL, Chase-Topping ME, Barry G, Attarzadeh-Yazdi G, Rodriguez-Andres J, Nash AA, Merits A, Fazakerley JK, Kohl A, 2011. Antiviral RNA interference responses induced by Semliki Forest Virus infection of mosquito cells: characterization, origin, and frequency-dependent functions of virus-derived small interfering RNAs. *J. Virol.*, 85(6):2907—2917.
- Tang B, Chen J, Yao Q, Pan Z, Xu W, Wang S, Zhang W, 2010. Characterization of a trehalose-6-phosphate synthase gene from *Spodoptera exigua* and its function identification through RNA interference. *J. Insect Physiol.*, 56(7):813—821.

- Terenius O, Papanicolaou A, Garbutt JS, Eleftherianos I, Huvenne H, Kanginakudru S, Albrechtsen M, An C, Aymeric JL, Barthel A, Bebas P, Bitra K, Bravo A, Chevalier F, Collinge DP, Crava CM, de Maagd RA, Duvic B, Erlandson M, Faye I, Felföldi G, Fujiwara H, Futahashi R, Gandhe AS, Gatehouse HS, Gatehouse LN, Giebultowicz JM, Gómez I, Grimmelikhuijzen CJP, Groot AT, Hauser F, Heckel DG, Hegedus DD, Hrycaj S, Huang L, Hull JJ, Iatrou K, Iga M, Kanost MR, Kotwica J, Li C, Li J, Liu J, Lundmark M, Matsumoto S, Meyering-Vos M, Millichap PJ, Monteiro A, Mrinal N, Niimi T, Nowara D, Ohnishi A, Oostra V, Ozaki K, Papakonstantinou M, Popadic A, Rajam MV, Saenko S, Simpson RM, Soberón M, Strand MR, Tomita S, Toprak U, Wang P, Wee CW, Whyard S, Zhang W, Nagaraju J, Ffrench-Constant RH, Herrero S, Gordon K, Swevers L, Smagghe G, 2011. RNA interference in Lepidoptera: An overview of successful and unsuccessful studies and implications for experimental design. *J. Insect Physiol.*, 57(2):231—245.
- Tian H, Peng H, Yao Q, Chen H, Xie Q, Tang B, Zhang W, 2009. Developmental control of a Lepidopteran pest *Spodoptera exigua* by ingestion of bacteria expressing dsRNA of a non-midgut gene. *PLoS ONE*, 4(7):e6225.
- Tijsterman M, May RC, Simmer F, Okihara KL, Plasterk RHA, 2004. Genes required for systemic RNA interference in *Caenorhabditis elegans*. *Curr. Biol.*, 14(2):111—116.
- Turner CT, Davy MW, MacDiarmid RM, Plummer KM, Birch NP, Newcomb RD, 2006. RNA interference in the light brown apple moth, *Epiphyas postvittana* (Walker) induced by double-stranded RNA feeding. *Insect Mol. Biol.*, 15(3):383—391.
- Ulvila J, Hultmark D, Rämét M, 2010. RNA silencing in the antiviral innate immune defence - role of DEAD-box RNA helicases. *Scand. J. Immunol.*, 71(3):146—158.
- Wang Y, Zhang H, Li H, 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(4):e18644.
- Yamaguchi J, Mizoguchi T, Fujiwara H, 2011. siRNAs induce efficient RNAi response in *Bombyx mori* embryos. *PLoS ONE*, 6(9):e25469.
- Yao Q, Zhang D, Tang B, Chen J, Chen J, Lu L, Zhang W, 2010. Identification of 20-Hydroxyecdysone late-response genes in the chitin biosynthesis pathway. *PLoS ONE*, 5(11):e14058.
- Zha W, Peng X, Chen R, Du B, Zhu L, He G, 2011. Knockdown of midgut genes by dsRNA-transgenic plant-mediated RNA interference in the Hemipteran insect *Nilaparvata lugens*. *PLoS ONE*, 6(5):e20504.
- Zhang X, Zhang J, Zhu KY, 2010. Chitosan/double-stranded RNA nanoparticle-mediated RNA interference to silence chitin synthase genes through larval feeding in the African malaria mosquito (*Anopheles gambiae*). *Insect Mol. Biol.*, 19(5):683—693.
- Zhou X, Wheeler MM, Oi FM, Scharf ME, 2008. RNA interference in the termite *Reticulitermes flavipes* through ingestion of double-stranded RNA. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 38(8):805—815.
- Zhu F, Xu J, Palli R, Ferguson J, Palli SR, 2011. Ingested RNA interference for managing the populations of the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*. *Pest Manag. Sci.*, 67(2):175—182.
- 王英, 黄复生, 2008. 昆虫天然免疫的研究进展. 免疫学杂志, 24(4):433—478.