储存条件对表达马铃薯甲虫腺苷高半胱氨酸水解酶基因 dsRNA 的大肠杆菌生物活性的影响*

李晓旭[1, 2**] 付开赟[3] 李国清[3] 王 刚[2] 吐尔逊[1] 何 江[1] 郭文超[1***]

（1. 新疆农业科学院植物保护研究所，乌鲁木齐 830091；2. 石河子大学农学院，石河子 832003；
3. 南京农业大学植物保护学院 农业部病虫害监测与治理重点开放实验室，南京 210095）

摘 要 **【目的】** 将 RNA 干扰应用于害虫防治领域，通过饲喂表达 dsRNA 的转基因植物或表达 dsRNA 的细菌，可沉默特定基因进而控制害虫，为农业害虫防治开辟一个新领域。而表达 dsRNA 的细菌能否有效储存是决定此项技术实际应用的关键。**【方法】** 用 −20℃冻存的表达马铃薯甲虫腺苷高半胱氨酸水解酶（SAHase）dsRNA 的大肠杆菌 *E.coli*，饲喂马铃薯甲虫 *Leptinotarsa decemlineata*（Say）2 龄幼虫，检测不同时间储存、灭活与否的活性变化，明确其储存条件。**【结果】** 大肠杆菌 −20℃储存 24 h 后生物活性优于新鲜菌，储存 48 h 后效果减弱，而载体大肠杆菌是否灭活对活性影响不大。**【结论】** dsRNA 大肠杆菌发酵液在 −20℃条件下可以短暂储存。

关键词 马铃薯甲虫，腺苷高半胱氨酸水解酶，dsRNA，RNA 干扰，储存条件

Storage conditions affect the toxicity of *E. coli* expressing *S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase* (*SAHase*) gene dsRNA to potato beetles

LI Xiao-Xu[1, 2**] FU Kai-Yun[3] LI Guo-Qing[3] WANG Gang[2]
Tuerxun[1] HE Jiang[1] GUO Wen-Chao[1***]

(1. Institute 0f Plant Protection, Xinjiang Academy of Agricultural Sciences, Urumqi 830091, China;
2. College of Agronomy, Shihezhi University, Shihezi 832003, China;
3. Education Ministry Key Laboratory of Management of Crop Diseases and Pests College of Plant Protection, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract **[Objectives]** By expressing double stranded RNA (dsRNA) in transgenic plants and in prokaryotic cells, RNA interference has potential applications in pest control. Determination of the influence of storage conditions on the toxic effects of dsRNA expressing *E. coli* is therefore of great importance for determining the effectiveness of such methods. **[Methods]** We stored living, or sterile, dsRNA expressing *E. coli* at −20℃ for different periods, and compared their toxicity to *Leptinotarsa decemlineata* larvae. **[Result]** *E. coli* that had been stored for 24 h had higher biological activity than fresh *E. coli*, however, this difference sharply decreased after 48 h. No significant difference was found between living and sterile dsRNA expressing *E. coli*. **[Conclusion]** Twenty-four hours storage under −20℃ has little influence on toxic effects of dsRNA expressing *E. coli*.

Key words *Leptinotarsa decemlineata*, S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase, dsRNA, RNAi, storage conditions

马铃薯甲虫 *Leptinotarsa decemlineata*（Say）是马铃薯种植业最具有毁灭性的食叶害虫，20 世纪 90 年代传入我国新疆，对新疆马铃薯生产造成严重危害。由于长期过度依赖化学防治，马

* 资助项目 Supported projects：新疆维吾尔自治区科技支疆计划资助项目（2013911091）；国家自然科学基金（31272047）
**第一作者 First author，E-mail：1900985154@qq.com
***通讯作者 Corresponding author，E-mail：gwc1966@163.com
收稿日期 Received：2013-12-10，接受日期 Accepted：2014-04-18

铃薯甲虫对现有注册化学农药几乎都产生了抗性（Alyokhin *et al.*，2007；梁沛等，2012）。任何新农药，使用 2~3 年便会产生抗药性（郭文超等，2013）。因此，探寻化学防治替代技术或无害化防治技术已成为国内外的研究热点。RNA 干扰方法自 1998 年被发现以来（Fire，1998），广泛应用于医疗、生物、动物科学、农业等领域。作为一项重要的基因功能研究技术，其在昆虫的发育、生殖以及行为等研究领域被广泛应用。近年来，一些研究人员拟将该技术开发应用于害虫防治领域，主要策略是构建表达 dsRNA 的转基因植物，害虫取食这类转基因植物时，特定基因被沉默，害虫生长发育受影响甚至死亡，从而为农业害虫防治开辟一个新领域。目前，这一方法的有效性已在鳞翅目、直翅目、膜翅目、同翅目、双翅目、等翅目等多种昆虫中得到证实（Mao *et al.*，2007；Baum *et al.*，2007；刘芳等，2011；刘婷等，2011）。本研究将这一工具应用于世界性检疫性害虫马铃薯甲虫的生物防治上（卢伟平，2011；郭文超等，2012），马铃薯甲虫生活史复杂多变（Alyokhin *et al.*，2008；Alyokhin，2009），保幼激素在马铃薯甲虫生活史中一些重要阶段，如变态（Vermunt *et al.*，1999）、繁殖（De Loof and De Wilde，1970；Dortland，1979；Lefevere and De Wilde，1984）以及滞育（De Wilde and De Boer，1969；De Loof and De Wilde，1970；Kramer，1978；Schooneveld *et al.*，1977；Lefevere and De Wilde，1984）等过程中起着关键作用。通过 RNA 干扰，有效的敲除马铃薯甲虫体内保幼激素合成相关的目的基因，可以为研究鞘翅目昆虫生活史相关激素分泌控制提供模板。目前已成功克隆马铃薯甲虫保幼激素合成相关基因多个，构建了表达 dsRNA 的大肠杆菌，进行了保幼激素代谢基因的 RNA 干扰试验。其中保幼激素酸甲基转移酶、法尼酸甲基转移酶和腺苷高半胱氨酸水解酶 3 个基因饲喂马铃薯甲虫幼虫后，具有明显的致死作用（周立涛，2013）。

目前，RNA 干扰过程中 dsRNA 导入昆虫通常有以下几个方法：注射、浸泡、喂食、转基因和病毒介导等（Schooneveld *et al.*，1977；Dzitoyeva *et al.*，2001；Eaton *et al.*，2002；Araujo *et al.*，2006）。而已有研究表明利用大肠杆菌表达 dsRNA 进行干扰的方法在线虫和小菜夜蛾等昆虫上取得显著效果（Zhu *et al.*, 2011），该方法操作简便，短时间可获得大量 dsRNA，菌株可以长期保存，本研究前期已在马铃薯甲虫上反复验证，开发了 dsRNA 对马铃薯甲虫干扰的方法（卢伟平，2011）。本文通过测试表达马铃薯甲虫腺苷高半胱氨酸水解酶 dsRNA 的大肠杆菌对马铃薯甲虫幼虫的作用，研究储存条件对大肠杆菌菌液的影响。研究结果对利用 RNA 干扰技术开发高效、专一性强、对人畜安全、对环境无污染的新型杀虫剂具有一定意义。

1 材料与方法

1.1 材料

供试马铃薯甲虫卵块、幼虫均采自新疆农科院安宁渠试验场马铃薯田。卵块置入光照培养箱，同一时间蜕皮的幼虫作实验用虫。温度 28℃，相对湿度 50%~60%，光周期 14L∶10D。成功转化质粒 PET-2p-SAHase HT115（DE3）大肠杆菌感受态细胞母液。

1.2 主要试剂及仪器

DNA 质粒提试剂盒，Omega 公司；酚氯仿异戊醇，STE Buffer，北京鼎国公司；DNA maker 2K，全式金公司。其他常规试剂均购自北京鼎国公司。

凝胶成像系统 Gel Doc2000，美国 Bio-Rad 公司；烘箱 MC000712，德国 MMM 公司；高压灭菌锅 SS-325，日本 TOMY 公司；5145D 型离心机，德国 Eppendoff 公司；凝胶成像系统，美国 Bio-rad 公司；离心机 Centrifuge 5424，德国 Eppendorf 公司；制冰机 SIM-F124，日本 SANYO 公司；超纯水器 E1IX10，美国 Millipore 公司；水平式核酸电泳仪，北京市六一仪器厂。

1.3 大肠杆菌表达 dsRNA 验证

1.3.1 母液培养 将已经成功转化 PET-2P-SAHase（目标 dsRNA 质粒）HT115（DE3）大

肠杆菌感受态细胞母液以 1∶1 000 的比例添加到含有 100 μg/mL 硫酸卡那霉素的 LB 液体培养基中，在 37℃、220 r/min 条件下恒温震荡 10 h 以上培养母液。

1.3.2　诱导表达　将培养后的大肠杆菌发酵液以 1∶100 的比例接种到含有 100 μg/mL 硫酸卡那霉素的 LB 液体培养基中，在 37℃、220 r/min 条件下恒温震荡 3.5 h，当菌液 OD600=1.0 时，加入 IPTG 至终浓度为 0.1 mol/L 新疆石河子和博州地区马铃薯甲虫抗药性检测，继续在同等条件下发酵 5 h，以诱导目标 dsRNA 的表达 。

1.3.3　凝胶电泳检测　取诱导后的发酵液离心浓缩，提取总核酸，进行 1%琼脂糖凝胶电泳。若发现特异性条带，则将样品分为两处理 :酶处理，将 RNase A 稀释 1 000 倍，在冰上操作；10 μL 总核酸条件 1 μL 稀释后的 RNase A，室温温育 5 min；与高温处理，将装有菌体的 EP 管置于 80℃以上水浴锅中 20 min，然后提取总核酸。

1.3.4　提取大肠杆菌总核酸的方法　取 1 mL 发酵液置于 1.5 mLEP 管中，10 000 g 离心 5 min，弃上清，沉淀物为大肠杆菌菌体，在 EP 管中分别添加 70 μL 的 STE buffer 和 70 μL 酚氯仿异戊醇（25∶24∶1，pH8.0），涡旋振荡 100 s 以上，13 000 g，4℃，离心 5 min，取上清液 40 μL，既为总核酸（Wan *et al.*，2013）。

1.4　大肠杆菌生产 dsRNA 不同储存条件处理

将含 dsSAHase 的大肠杆菌发酵液在 10 000 g 离心浓缩 5 min，弃上清，将菌体进行下一步处理。离心浓缩后的菌体继续分为两处理，处理 1 为将菌体在 - 20℃条件下储存 24，48，72 h；处理 2 为将菌体在 80℃以上水浴 20 min，灭活后在 - 20℃条件下储存 24，48，72 h。

1.5　不同处理 dsSAHase 生物活性结果检测

用超纯水将各处理 dsSAHase 大肠杆菌菌体悬浮，按照每毫升菌液表达量进行配比，配置最终浓度为 2.5 μg/mL。将配好浓度的悬浮液取 1 mL 均匀涂抹在新鲜马铃薯叶片上，电扇吹风直至吹干。选取马铃薯甲虫 2 龄幼虫，每处理设置 4 次重复，每个重复 8 头置于 9 cm 标准培养皿中。培养皿底部铺一层滤纸。将晾干后的涂抹菌液马铃薯叶片置于培养皿中，每日更换滤纸与处理叶片，3 d 后更换未处理新鲜叶片。观察各处理 dsSAHase 生物活性，直至预蛹（Sharif *et al.*，2007）。

2　结果与分析

2.1　凝胶电泳确定 dsSAHase

添加 IPTG 诱导（“+”表示）发酵后，用琼脂糖凝胶电泳确定大肠杆菌发酵液中是否有 dsSAHase，结果如图 1。添加 IPTG 诱导的大肠杆菌核酸多出一条特异性条带，即目标条带 dsSAHase。由于 dsRNA 为双链 RNA，相对比较稳定，高温或 RNase A 酶处理后，单链 RNA 被降解掉，而双链 RNA 降解速度较慢，经 IPTG 诱导的大肠杆菌核酸目标位上的 dsSAHase 条带仍在（图 1）。表明大肠杆菌表达 dsSAHase。

2.2　dsSAHase 载体大肠杆菌 - 20℃储存不同时间饲喂试虫表型变化

表达 dsSAHase 菌体在 - 20℃储存 24 h 后饲喂幼虫，其表观特征发生变化（图 2）。试虫出

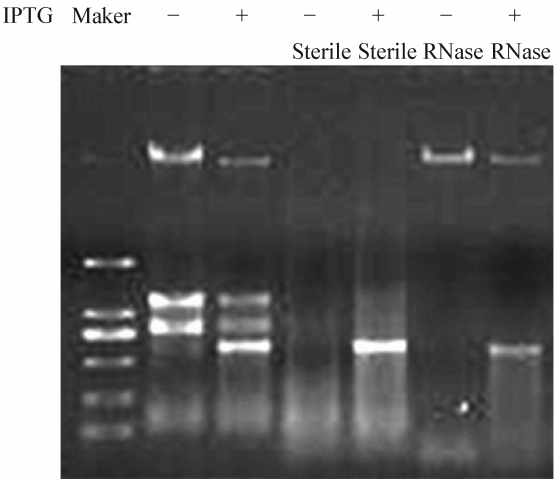


图 1　dsRNA 表达载体大肠杆菌菌液总核酸提取琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 1　Electrophoresis analysis of the total nucleic acid extracted from *E. coli*

现虫体较小，体色较深，取食量少或不取食的现象；储存 48 h 和 72 h 后，饲喂幼虫取食量相对较大。纯水对照中虫体较大，部分幼虫出现预蛹现象。对照试虫在饲喂 6 d 后出现预蛹现象，饲喂 9 d 后全部进入预蛹状态。可见，饲喂表达 dsSAHase 的菌体使试虫发育相应推迟，其中储存 24 h 后饲喂发育最晚，有部分试虫化蛹推迟到 10 d 以后，甚至不化蛹，最终死亡；与对照相比，表达 dsSAHase 菌体储存 48 h 和 72 h 后饲喂的试虫发育推迟和化蛹率降低，但显著高于储存 24 h 处理。由此可知，dsSAHase 除具有致死作用和拒食作用外，还具有延长幼虫发育和降低化蛹率的作用（图 2）。

2.3 dsSAHase 载体大肠杆菌灭活后 - 20℃储存不同时间处理结果

储存 24 h 后饲喂，与新鲜菌液饲喂试虫相比，对马铃薯甲虫幼虫的死亡率明显提高。表明经过一定时间的冻存后，灭活 dsSAHase 菌体的活性有所提高。储存 48 h 后，表达 dsSAHase 大肠杆菌菌体的致死作用较弱。可以看出，表达 dsSAHase 大肠杆菌菌体 - 20℃储存 24 h 后饲喂马铃薯甲虫 2 龄幼虫 2～3 d 后出现死亡，新鲜 dsSAHase 菌体饲喂马铃薯甲虫幼虫通常在 3 d 后出现死亡（表 1）。

运用 SPSS 软件对各处理马铃薯甲虫 2 龄幼虫累积死亡率进行分析，饲喂储存 24 h 的 dsSAHase 菌体后，幼虫死亡率在 P=0.05 水平上均显著高于其他处理幼虫的死亡率，储存 72 h 后，dsSAHase 菌体饲喂幼虫死亡率显著高于对照，而饲喂储存 72 h dsSAHase 菌体与饲喂储存 48 h dsSAHase 菌体之间、饲喂储存 48 h dsSAHase 菌体与对照之间的幼虫死亡率差异不显著（表 1）

2.4 - 20℃下储存不同时间未灭活 dsSAHase 大肠杆菌载体处理结果

未灭活的表达 dsSAHase 菌体饲喂幼虫 2～3 d 后出现死亡，且死亡率随时间延长而增加，直至大部分试虫出现预蛹现象。其中储存 24 h 后饲喂试虫，表达 dsSAHase 菌体表现出显著的致死作用。新鲜菌液饲喂的马铃薯甲虫 2 龄幼虫死亡一般在 3 d 后出现，实验还发现未灭活菌液 - 20℃暂存一段时间后对 dsSAHase 生物活性具有一定

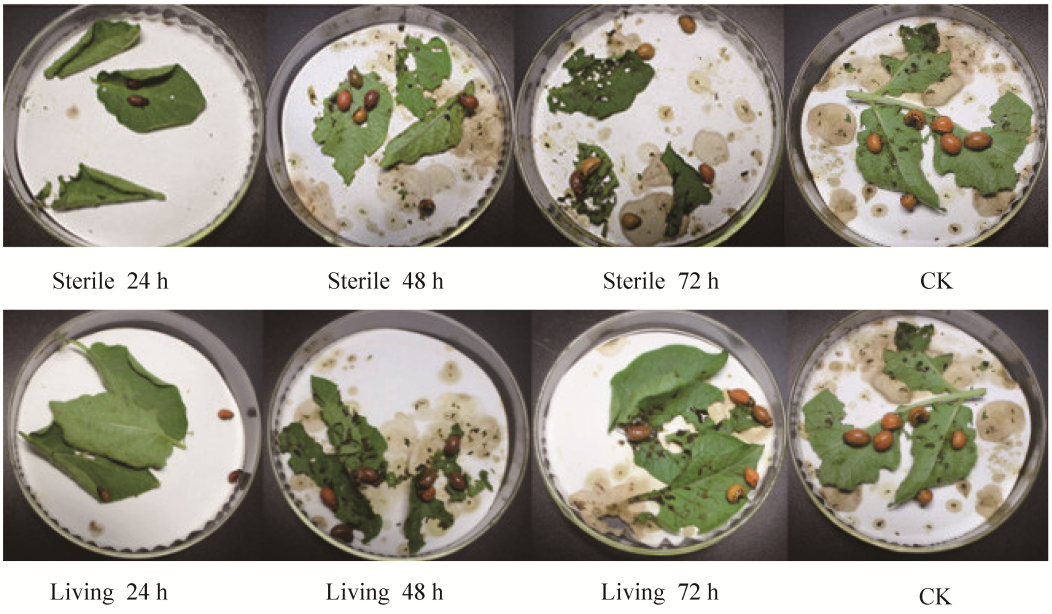


图 2 饲喂各处理表达 dsSAHase 菌株马铃薯甲虫幼虫的表型变化

Fig. 2 Abnormal phenotype of *Leptinotarsa decemlineata* after continuous exposure to dsRNA expressing *E. coli*

的增效作用（表 2）。

表达 dsSAHase 大肠杆菌未灭活储存不同时间饲喂马铃薯甲虫 2 龄幼虫与表达 dsSAHase 大肠杆菌灭活后饲喂马铃薯甲虫 2 龄幼虫死亡率基本一致，表明在致死效果上，感受态大肠杆菌是否灭活，对 dsSAHase 致死作用影响不大（表 2）。

2.5　对试虫体重影响

各处理饲喂的马铃薯甲虫早期表现出体重增长的趋势（图 3），在 3 d 后停止饲喂菌液处理的叶片，储存 24 h dsSAHase 菌体饲喂的马铃薯甲虫均表现出体重不再增长或轻微下降，饲喂储存 48 h dsSAHase 菌体和 72 h dsSAHase 菌体虽然在持续增长，但相比于对照，其增长速率有所下降。运用 SPSS 软件对各数据进行了多重比较分析。

对灭活后储存 dsSAHase 菌体各处理结果进行多重比较分析，储存 24 h 时 dsSAHase 活性最强，试虫体重显著低于其他处理，在 48 h 后 dsSAHase 活性则减弱，储存 48 h 与储存 72 h 处理试虫体重差异不显著（P=0.05）。储存 72 h 处理与储存 48 h、储存 72 h 与对照处理试虫体重差异不显著（P=0.01）（图 3）。

对未灭活储存 dsSAHase 菌体各处理幼虫体重进行多重比较分析，饲喂储存 24 h 表达 dsSAHase 菌体试虫体重显著低于其他处理，饲喂储存 48 h 表达 dsSAHase 菌体的试虫体重显著低于对照，其余各处理之间差异不显著（P=0.05）。储存 24 h 处理试虫体重显著低于对照，其余各处理之间差异不显著（P=0.01）。该结果与 dsSAHase 表达载体灭活后储存不同时间处理饲喂幼虫的结果基本一致。

表 1　喂食灭活 dsRNA 的菌株不同处理的马铃薯甲虫死亡率

Table 1　The mortality of *Leptinotarsa decemlineata* larvae after continuous exposure to sterile dsRNA expressing *E. coli*

累积死亡率（%） Cumulative mortality (%)	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d	8 d	9 d
24 h	0.00	0.00	12.50	15.63	15.63	25.00 a	37.50 a	56.25 a	68.75 a
48 h	0.00	0.00	3.13	9.38	9.38	9.38 ab	12.50 bc	12.50 b	15.63 cd
72 h	0.00	0.00	6.25	6.25	9.38	9.38 ab	18.75 b	18.75 b	25.00 bc
对照 CK	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00 bc	3.13 c	3.13 b	3.13 d

表中数据后标有字母表示数据之间差异的显著性，数据后标有相同字母的表示两数据之间差异不显著。差异性结果由 SPSS 分析得出（P=0.05）。下表同。

The letters after date in the table mean significant differences. Data followed by the same letters indicates no significant difference between the two data. The results about siginificant differences is obtained by SPSS (P= 0.05). The same below.

表 2　不同处理喂食未灭活 dsRNA 菌株马铃薯甲虫死亡率

Table 2　The eventually mortality of *Leptinotarsa decemlineata* larvae after continuous exposure to living dsRNA expressing *E. coli*

累积死亡率（%） Cumulative mortality (%)	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d	8 d	9 d
24 h	0.00	9.38	12.50	21.88 ab	31.25 a	37.50 a	46.88 a	59.38 a	68.75 a
48 h	0.00	0.00	3.13	3.13 c	3.13 b	9.38 b	9.38 b	12.50 bc	15.63 cd
72 h	0.00	0.00	9.38	9.38 bc	9.38 b	12.50 b	18.75 b	21.88 b	25.00 bc
对照 CK	0.00	0.00	0.00	0.00 c	0.00 b	0.00 b	3.13 b	3.13 c	3.13 d

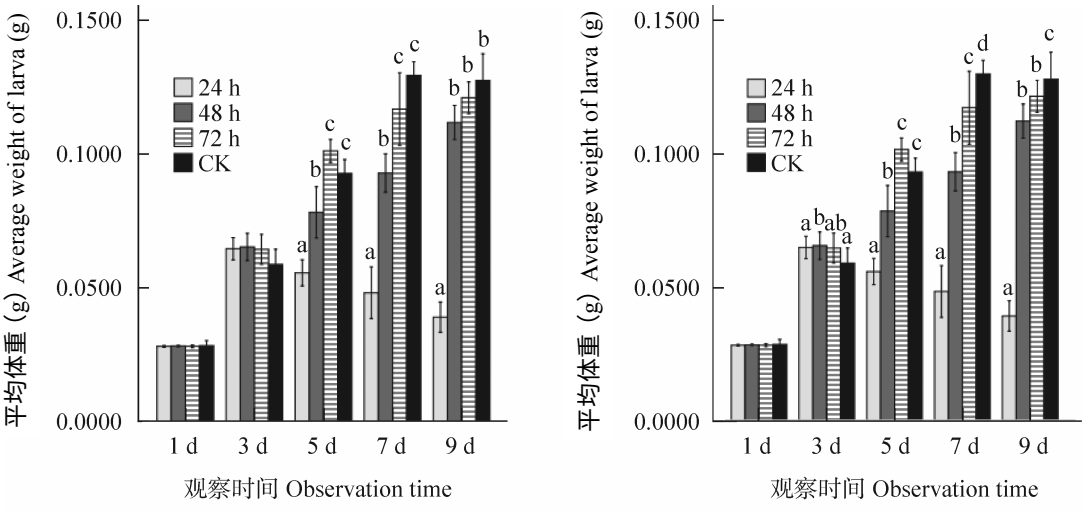


图 3　喂食不同处理 dsRNA 的菌株后马铃薯甲虫体重随时间的变化

Fig. 3　The body weight (g) of *Leptinotarsa decemlineata* larvae after continuous exposure to dsRNA expressing *E. coli*

图中左为大肠杆菌未灭活处理，右为大肠杆菌灭活处理。

The left is exposure to living dsRNA expressing *E. coli*. The right is exposure to sterile dsRNA expressing *E. coli*.

3　结论

将质粒 PET-2p-SAHase 体外克隆到大肠杆菌感受态细胞，诱导表达 dsSAHase 后，不同的储存条件对其活性影响很大。在本研究中设置的时间、dsRNA 大肠杆菌是否灭活等处理因素中，储存时间起到决定性作用，实验结果表明表达 dsSAHase 菌体储存 24 h 后，dsSAHase 生物活性较高，载体大肠杆菌菌体储存 48 h 后 dsSAHase 仍表现出一定的活性，对其处理后幼虫死亡率、体重与对照的相比存在一定差异，但其活性远低于载体大肠杆菌菌体储存 24 h 和新鲜的表达 dsSAHase 大肠杆菌菌体。而感受态细胞大肠杆菌灭活前后，dsSAHase 在致死作用、拒食作用和延迟发育上结果相似，表明 dsSAHase 大肠杆菌载体是否高温灭活对 dsSAHase 的生物活性影响不大。而储存 24 h 的表达 dsSAHase 大肠杆菌菌体与新鲜表达 dsSAHase 菌体饲喂相比，前者表现出相对较高的致死作用，生物活性略有提高。此外，dsSAHase 对马铃薯甲虫幼虫除具有致死作用、拒食作用外，还具有一定推迟其发育的作用，表现为试虫幼虫龄期延长，化蛹推迟，甚至导致某些处理幼虫个体不能化蛹。

4　讨论

对表达 dsSAHase 的 EcoRI 大肠杆菌发酵液进行酶处理和高温处理后，其他 RNA 条带消失，而目标 dsRNA 条带仍在。这是由于 dsRNA 为双链，其稳定性比一般单链 RNA 高，对高温和 RNA 酶的耐受力强于单链 RNA。但进行酶处理的 dsSAHase 条带亮度不如高温处理过的，可能与 RNase 的浓度以及孵育时间长短有关，而高温处理使酶失活，单链 RNA 变性降解，dsSAHase 部分受影响或未受影响，因此条带仍较清晰。

将各处理菌液提取总核酸后进行 1%琼脂糖凝胶电泳，结果表明表达 dsSAHase 的大肠杆菌未灭活保存 3 个时间梯度后总核酸在 1%琼脂糖凝胶板上均有较亮的条带，表达 dsRNA 大肠杆菌灭活后则储存 24 h、48 h 与新鲜表达 dsSAHase 大肠杆菌总核酸亮度差异不大，既仍有较多的 dsSAHase，但储存 48 h 与 72 h 的表达 dsSAHase 菌体生测结果较差。可能是由于储存 48 h 后，dsSAHase 对饲喂环境中或马铃薯甲虫幼虫中肠的逆境条件内耐受性变弱。换言之，新鲜菌体与储存时间较短的菌体相比，其更容易在饲喂导入过程中降解。此外，与新鲜菌体饲喂对比，在一

定低温下冻存一段时间，可使 dsSAHase 生物活性进一步提高，可能在低温冻存解冻过程中，大肠杆菌细胞破裂，充分释放 dsSAHase，使其更易发挥作用。

从本研究结果分析，直接储存表达 dsRNA 的大肠杆菌，其生物活性会随着储存时间延长逐步丧失。因此，可以考虑在菌液中添加一些稳定剂，以利于 dsRNA 的稳定性。已有研究表明一些递送试剂如胶质化合成试剂、去端肽胶原、自制明胶、以及鱼精蛋白抗体融合蛋白可减缓 dsRNA 在导入过程中的降解速率（Chiu *et al.*，2004；Layzer *et al.*，2004；Takeshita *et al.*，2005；Matsumoto *et al.*，2006），其中聚阳离子聚乙烯亚胺（PEI）已被广泛的应用在 RNA 干扰技术中（Kim *et al.*，2006；Deshpands and Prausnitz，2007），与 dsRNA 结合，形成复合物，以提高 dsRNA 稳定性。但在马铃薯甲虫保幼激素合成相关基因 RNA 干扰过程中，尚未得到应用，关于这一问题尚需进一步深入研究。

参考文献 (References)

Alyokhin A, 2009. Colorado potato beetle management on potatoes: Current challenges and future prospects. *Fruit, Vegetable and Cereal Science and Biotechnology*, 3(Special Issue 1): 10–19.

Alyokhin A, Baker M, Mota-Sanchez D, Dively G, Grafius E, 2008. Colorado potato beetle resistance to insecticides. *American Journal of Potato Research*, 85(6): 395–413.

Alyokhin, A, Dively, G, Patterson, M, Castaldo, C, Rogers, D, Mahoney M, Wollam J，2007. Resistance and cross-resistance to imidacloprid and thiamethoxam in the Colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata*. *Pest Management Science*, 63(1): 32–41.

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.

Baum JA, Bogaert T, Clinton W, Heck GR, Feldmann P, Ilagen O, Johnson S, Plaetinck G, Munyikwa T, Pleau M, Vaughn T, Roberts J, 2007. Control of coleopteran insect pests through RNA interference. *Nat. Biotechnol.*, 25(11): 1322–1326.

Chiu YL, Ali A, Chu CY, Cao H, Rana TM, 2004. Visualizing a correlation between siRNA localization, cellular uptake, and RNAi in living cells. *Chem. Biol.*, 11(8): 1165–1175.

De Loof A, De Wilde J, 1970. Hormonal control of synthesis of vitellogenic female protein in the Colorado beetle, *Leptinotarsa decemlineata*. *Journal of Insect Physiology*, 16(7): 1455–1466.

Dortland JF, 1979. The hormonal control of vitellogenin synthesis in the fat body of the female Colorado potato beetle. *General and Comparative Endocrinology*, 38(3): 332–344.

Deshpands MC, Prausnitz MR, 2007. Synergistic effect of ultrasound and PEI on DNA transfectionin vitro. *J. Control. Release*, 118(1): 126–135

De Wilde J, De Boer, JA, 1969. Humoral and nervous pathways in photoperiodic induction of diapause in *Leptinotarsa decemlineata*. *Journal of Insect Physiology*, 15(4): 661–675.

Dzitoyeva S, Dimitrijevic N, Manev H, 2001. Intra-abdominal injection of double-stranded RNA into anesthetized adult Drosophila triggers RNA interference in the central nervous system. *Molecular Psychiatry*, 6(6): 665–670.

Eaton BA, Fetter RD, Davis GW, 2002. Dynactin is necessary for synapse stabilization. *Neuron*, 34(5): 729–741.

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.

Guo WC, Tuxun, Zhou GL, Liu ZJ, Zhang XL, Qin XH, Li J, Zhang W, 2012. The status quo and trend of invasive alien species in agriculture & forest in Xinjiang, China and relevant countermeasures. *Xinjiang Agricultural Sciences*, 49(1): 80–100. [郭文超, 吐尔逊, 周桂玲, 2012. 新疆农林外来生物入侵现状、趋势及对策. 新疆农业科学, 49(1): 80–100.]

Guo WC, Tan WZ, Zhang QW, 2013. Biology and Integrated Management of the Invasive Alien Pest Colorado Potato Beetle. Beijing: Science Press. 25–31.[郭文超, 谭万忠, 张青文, 2013. 重大外来入侵害虫-马铃薯甲虫生物学、生态学与综合防控. 北京: 科学出版社. 25–31.]

Kim K, Lee M, Park H, 2006. Cell-permeable and biocompatible polymeric nanoparticles for apoptosis imaging. *J. Am. Chem. Soc*., 128(11): 3490–3491.

Kramer SJ, 1978. Age-dependent changes in corpus allatum activityin vitro in the adult Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*. *Journal of Insect Physiology*, 24: 461–464.

Layzer JM, McCaffrey AP, Tanner AK, Huang Z, Kay MA, Sullenger BA, 2004. In vivo activity of nuclease-resistant siRNAs. *RNA*, 10(5): 766–771.

Lefevere KS, De Wilde J, 1984. Effect of photoperiod and allatectomy on reproduction and (second) diapause induction in post-diapause adult females of the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* Say. *International Journal of*

Invertebrate Reproduction and Development, 7(1): 69–72.

Liu F, Li ZG, Li WF, Su SK. 2011. RNAi technology and its application in honeybee science researches.*Chinese Journal of Applied Entomology*, 48(2): 417–420. [刘芳, 李志国, 李文峰, 苏松坤, 2011. RNAi 技术在蜂学研究中的应用. 应用昆虫学报, 48(2): 417–420.]

Liu T, Qin GH, Zhang JZ, Ma EB, 2011. The RNA interference efficiency of glutathione S-transferases from Locusta migratoria manilensis. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 48(4): 24–29. [刘婷, 秦国华, 张建珍, 马恩波, 2011. 东亚飞蝗谷胱甘肽 S-转移酶 RNA 干扰效率研究. 应用昆虫学报, 48(4): 24–29.]

Liang P, Wang JG, Wu XR, Gao XW, 2012. Detection of insecticide resistance in Leptinotarsa decemlineata from the Shihezi and Bozhou areas. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 49(2): 370–375.[梁沛, 王俊刚, 武晓蕊, 高希武, 2012. 新疆石河子和博州地区马铃薯甲虫抗药性检测. 应用昆虫学报, 49(2): 370–375.]

Lou LJ, Shi X, Luo MZ, 2012. Construction of OsVIP1 RNAi transgenic rice plants. *Journal of Hua zhong Agricultural University*, 31(2): 152–158. [娄丽娟, 史雪, 罗美中, 2012. OsVIP1 RNAi 转基因水稻植株的构建. 华中农业大学学报, 31(2): 152–158.]

Lu WP, 2011. Toxicities of several newly-typed insecticides to Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Say) and molecular cloning of two kinds of targets. Master Degree Dissertation. Nanjing : Nanjing Agricultural University. [卢伟平, 2011. 几种新型杀虫剂对马铃薯甲虫的毒力及两类靶标的分子克隆. 硕士学位论文. 南京: 南京农业大学.]

Matsumoto G, Kushibiki T, Kinoshita Y, Lee U, Omi Y, Kubota E, Tabata Y, 2006. Cationized gelatin delivery of a plasmid DNA expressing small interference RNA for VEGF inhibits murine squamous cell carcinoma. *Cancer Sci.*, 97(4): 313–321.

Mao YB, Cai WJ, Wang JW, Hong GJ, Tao XY, Wang LJ, Huang YP, 2007. Silencing a cotton bollworm P450 monooxygenase gene by plant-mediated RNAi impairs larval tolerance of gossypol. *Nat. Biotechnol.*, 25(11): 1307–1313.

Schooneveld H, Otazo Sanchez A, De Wilde J, 1977. Juvenile hormone-induced break and termination of diapause in the Colorado potato beetle. *Journal of Insect Physiology*, 23(6): 689–696.

Sharif M, Hejazi M, Mohammadi A, Rashidi MR, 2007. Resistance status of the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*, to endosulfan in East Azarbaijan and Ardabil provinces of Iran. *Journal of Insect Science*, 31(7): 1–7.

Takeshita F, Minakuchi Y, Nagahara S, Honma K, Hirai K, Teratani T, Namatame N, Yamamoto Y, Hanai K, Kato T, Sano A, Ochiya T, 2005. Efficient delivery of small interfering RNA to bone-metastatic tumors by using atelocollagen in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102(24): 12177–12182.

Vermunt AMW, Koopmanschap AB, Vlak J, De Kort CAD, 1999. Expression of the juvenile hormone esterase gene in the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*: photoperiodic and juvenile hormone analog response. *Journal of Insect Physiology*, 45(2): 135–142.

Wan PJ, Lü D, Guo WC, Tursun A, Yang L, Mu LL, Li GQ, 2013. Molecular cloning and characterization of a putative proline dehydrogenase gene in the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*(Say). *Insect Science*, 21(2): 147–158.

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 Management Science,* 67(2): 175–182.

Zhou LT, 2013. Cloning and characterization of genes related Juvenile hormone biosynthesis and signalling in Leptinotarsa decemlineata (Say). Master Degree Dissertation. Nanjing : Nanjing Agricultural University.[周立涛, 2013. 马铃薯甲虫保幼激素合成与信号转导相关基因的克隆和功能分析. 硕士学位论文. 南京: 南京农业大学.]