

花绒寄甲成虫 3 条 *Mthl* 基因及 *Mth-like* 2-5 干扰效果研究

李小辉,张正青,胡宏焰,单聪聪,Dinh Ngoc Hien,李孟楼*

(西北农林科技大学 林学院,陕西 杨陵 712100)

摘 要:筛选花绒寄甲成虫高表达的 *mthl* 基因,注射目标基因 dsRNA,以确定干扰效果并解析其功能。合成花绒寄甲成虫目标基因 *mthl* 保守序列的 dsRNA,分别注射 0.3、1.2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 和 4.8 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的 dsRNA,利用实时荧光定量 PCR 技术检测目标基因的表达量,记录处理组虫体的体重、存活率和雌虫产卵情况。从花绒寄甲转录组数据库中分别鉴定出 *Mth-like* 11、*Mth-like* 2-4、*Mth-like* 2-5 基因。注射目标基因 *Mth-like* 2-5 的长度约 400 bp 的 dsRNA,对目标基因表达干扰效果显著,但干扰过程中雌雄虫均具有应激表达反应。其中 0.3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 低浓度 dsRNA 对目标基因干扰效果差,应激高表达反应明显;1.2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 中等浓度 dsRNA 对目标基因有显著的干扰效果,应激高表达反应弱、引起的体重下降和死亡率较小,雌虫产卵期推迟;4.8 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 高浓度 dsRNA 干扰效果显著,引起的体重下降和死亡率较高,雌虫难以产卵。注射 *Mth-like* 2-5 dsRNA 可影响 *Mth-like* 2-5 基因的正常表达和转录,随 dsRNA 浓度增大和处理后时间的延长,目标基因表达量、雌雄成虫体重明显降低,死亡率增高,雌成虫产卵期推迟或难以产卵。

关键词:花绒寄甲成虫;*Mthl* 基因;*Mth-like* 2-5 基因;RNA 干扰

中图分类号:S763.38 **文献标志码:**A **文章编号:**1001-7461(2019)02-0170-09

Three *mthl* Genes and RNA Interference Effect of *Mth-like* 2-5 in the Adult of *Dastarcus helophoroides*

LI Xiao-hui, ZHANG Zheng-qing, HU Hong-yan, SHAN Cong-cong, Dinh Ngoc Hien, LI Meng-lou*

(College of Forestry, Northwest A&F University, Yangling 712100, Shaanxi, China)

Abstract: The high-expression *mthl* gene was screened and the target gene dsRNA was injected to determine the interference effect and analyze its function in *Dastarcus helophoroides*. Synthetic *mthl* gene target gene conservative sequence of dsRNA was injected in the adult of *D. helophoroides* with dosages of 0.3, 1.2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ and 4.8 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ dsRNA respectively. Real-time qPCR technique was used to detect the expression of target genes. The body weight of treatment group, survival rate, and the conditions of female egg-laying were recorded. The results showed that, *Mth-like* 11, *Mth-like* 2-4 and *Mth-like* 2-5 genes were identified from the transcriptome database of *D. helophoroides*. The length of the target gene *Mth-like* 2-5 was about 400 bp dsRNA, which had a significant effect on the expression of the target gene. Low concentration dsRNA with 0.3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ had poor interference effect on target genes and obvious high expression response to stress. Medium concentration dsRNA (1.2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) had significant interference effect on target genes with weak high expression response to stress, decreased weight and low mortality, and delayed spawning period of female. High concentration dsRNA (4.8 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) had significant interference effect, resulting in weight loss and high mortality, and female was difficult to lay eggs. Injected *Mth-like* 2-5 dsRNA could affect the normal expression and transcription of the *Mth-like* 2-5 genes; with the increase of concentration

收稿日期:2018-05-25 修回日期:2018-08-16

基金项目:国家自然科学基金(31170608)。

作者简介:李小辉,女,硕士,研究方向:森林保护。E-mail:1515374673@qq.com

* 通信作者:李孟楼,男,教授,研究方向:森林害虫防治及花椒研究。E-mail:limenglou@126.com

of dsRNA and the extension of processing time, the target gene expression, male and female adult weight decreased, mortality rate increased, female adult spawning period delayed or was difficult to lay eggs.

Key words: *Dastarcus helophoroides*; *mthl* genes; *Mth-like* 2-5 genes; RNA interference

最早发现于果蝇(*Drosophila melanogaster*)的 *Mth* 基因编码是一个 G 蛋白偶联受体(玛士沙拉受体 *Mthuselah*, *Mth*), 该受体属于 B 家族^[1]。昆虫 *Mth* 受体可能通过 Stunted-Methuselah 系统来调控与之相偶联的 G 蛋白及其下游信号通路, 参与调节昆虫的寿命、应激反应和感知运动能力等^[2-3]。Lin 发现 *Mth* 基因的突变使果蝇的寿命延长了 35%, 并且对饥饿、高温和百草枯等一系列外界胁迫因素的抵抗能力也显著提高^[4], 其他研究也表明 *Mth* 基因在延缓果蝇衰老、加强感知运动能力以及胚胎发育方面也有重要作用^[3, 5-7]。

研究证明, 非果蝇昆虫中不存在 *Mth* 基因, 只发现有 *Mth* 的同源基因^[7], 已发现的 *Mth* 一系列同源基因统称为 *methuselah-like* (*mth-like*, *Mthl*), 但 *Mth* 和 *Mthl* 是否有相同的功能还不清楚^[8]。Mendoza 在 *Mthl* 基因之间系统遗传分析中鉴定了来自昆虫以外不同物种的 44 条 *Mthl* 基因, 发现 *Mthl* 基因也存在于原肢动物以及后口动物中, 但因经历无数次物种的灭绝和扩张, 导致有些 *Mthl* 同源基因在脊椎动物和昆虫中发生了缺失^[9]。

在基因调控和功能研究中, A. Fire^[10]等发现通过引入 dsRNA(或 siRNA)诱导的对靶标基因 mRNA 进行沉默, 从而达到干扰目标基因 mRNA 表达、再对其功能进行研究的目的, 该技术即为 RNAi (RNA interference) 技术。由于该技术具有操作简便、实验成本相对较低、特异性较高等特点, 在动、植物和昆虫的基因功能及其表达研究中已广泛应用^[7, 11-13]。在昆虫基因功能、RNAi 介导的转基因抗虫植物以及益虫疾病控制等方面, 已广泛采用精确地控制注入 dsRNA 剂量以及灵活调整注射部位, 取得高水平的干扰效果^[14-17]。

花绒寄甲(*Dastarcus helophoroides*)属于鞘翅目寄甲科昆虫。其幼虫寄生在天牛末龄幼虫和蛹上, 是一种重要的天敌昆虫, 可有效防治大型天牛类蛀干害虫^[18-21], 其繁殖和生活特性与其他昆虫有巨大的差异, 在人工喂养的条件下可以存活 8 年^[22]。本试验已经研究了细胞色素 P450^[23]、细胞凋亡及抗氧化酶系统^[24]与花绒寄甲衰老的关系及 Methuselah(MTH)调控寿命基因在体内的表达^[25]。通过对花绒寄甲的 *Mthl* 基因的鉴定和表达研究, 发现花绒寄甲具有 9 条 *Mthl* 基因, 未研究的基因是 *Mthl*-Unigene17714、*Mthl*-Unigene5825、*Mthl*-

CL58C2; 已研究的基因是 *mth-like*1、*mth-like*2-1、*mth-like*2-2、*mth-like*2-3、*mth-like*5-1、*mth-like*5-2, 这 6 条基因在不同虫态和不同组织中均有表达, 且表达量随存活时间的延长显著下调; 在经过氧化、高温及饥饿不同条件胁迫后, *Mthl* 基因表达量变化显著^[25]。但还未见有关花绒寄甲 *Mthl* 沉默及其功能研究的报道。因此, 在以上研究基础上, 利用 RNAi 技术干扰花绒寄甲 *Mthl*-CL58C2 的表达, 观察对试虫生长发育、繁殖及生存的影响, 期望进一步揭示 *Mthl*-CL58C2 基因的功能。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

材料: 试验所用的花绒寄甲幼虫、蛹和成虫均由西北农林科技大学林学院森林害虫生物控制实验室饲养和提供, 饲养温度为 $(23 \pm 1)^{\circ}\text{C}$, 相对湿度(RH)为 70%~80%^[26]。

药剂: UNIQ-10 Trizol 总 RNA 抽提试剂盒, 江苏 Vazyme HiScript Reverse Transcriptase 试剂盒, 北京天根 Universal DNA 胶回收纯化试剂盒; 日本 Takara PMD^{18-T} 质粒; Promega USA T7 RibomaxTM Express RNAi System。

1.2 花绒寄甲 3 条未获登陆号 *Mthl* 基因的鉴定

从建立的花绒寄甲转录组基因库中检索到了 9 条 *Mthl* 基因。其中 6 条已进行序列全长、表达量研究, 并获得了登录号^[22, 27]。3 条未获登陆号的基因分别是 *Mthl*-Unigene17714、*Mthl*-Unigene5825、*Mthl*-CL58C2, 使用 NCBI 上的 Blastx 在线工具, 对这 3 条基因进行分析和鉴定。

1.3 总 RNA 提取和 cDNA 合成及干扰基因的选择

总 RNA 提取和 cDNA 合成: 用 UNIQ-10 Column Trizol Total RNA Isolation Kit, (Sangon Biotech, Shanghai, China) 提取 2 头初孵花绒寄甲成虫总 RNA, 经 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳检测其完整性后, 利用微量核酸分析仪测定其浓度和纯度 ($\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}=1.80\sim 2.10$), 取 $1\mu\text{g}$ 总 RNA, 按照 HiScript Reverse Transcriptase 试剂盒说明书合成 cDNA^[25]。

干扰基因选择: 取刚羽化的成虫(雌、雄)3 组, 每组 2 头, 提取各组总 RNA, 反转录成 cDNA。以 EF-1 α 为内参, 采用实时荧光定量 PCR 检测 9 条 *Mthl* 基因的相对表达量^[25]。然后, 选取成虫期表

表 1 9 条基因的引物及其信息

Table 1 Primers used in the test and their information

基因名称	引物序列	退火温度/℃	用途	扩增子/bp
Unigene17714	F:ACATTTTCAAGTGGTCGTGGGCAGT	61	全长扩增	1 183
	R:CGTTGTAAGCTCAGAGGTATCCGTG			
	F:ATTCGTAAATGTTGCCCGC	60	定量	126
	R:ACTGCCCACGACCACTTGA			
CL58C2	F:TAAGTGTATTGAAGGGTTTG	55	全长扩增	1 373
	R:GCTCAGAGGTATCCGTGTT			
	F:AAACCGCATTTCGCTCAT	55	定量	145
	R:TTCTTAAACAGGTCGGATCTA			
	F:TAATACGACTCACTATAGG	60	合成 dsRNA	412
	TTAGGATTCAAGCGGACTTCGT			
	R:TAATACGACTCACTATAGG			
	CCATTGACCAGTTTACACCCA			
Unigene5825	F:GTGCGTGGAATAGCGTGAGT	60	全长扩增	1 377
	R:CATCCGTGGAGGTTGTAGAGG			
	F:CCGTCACCAGATGGGTCAAA	60	定量	129
	R:GGAGAGTGGCCATGCAGTAG			
mth-like1 KM588897	F:GGTTATTTGCTTCCCGCCTCT	60	定量	136
	R:GGAGAATGTCGCCGATGAGA			
mth-like2-1 KU363814	F:AACCACCGAAACTTCCGATAA	55	定量	132
	R:TGCGTGTAAACTTCGTGTGA			
mth-like2-2 KU363815	F:GAAGTGTTGTCCACCCGGTC	60	定量	128
	R:TCCGAAGACGAAACCAGCAC			
mth-like2-3 KM588898	F:CATCATACTCGTGCTTCTGCG	59	定量	124
	R:GAGCGTTCGCCATTTGTTAGG			
mth-like5-1 KU363816	F:ACTATTCGGCATAACGCTTGGTC	60	定量	130
	R:CAGTGATCCGATTTCTTCCCG			
mth-like5-2 KU363817	F:TGCCGCTTTTGAAGATGAGG	60	定量	149
	R:TCCAGTCGGTGGGGTGCT			
EF- 1α	F:TCCTTCAAATATGCCTGGGTACT	60	定量	137
	R:AAATCTCTGTGTGTCCAGGGGCAT			

达较高的一条 *Mthl* 基因做 RNA 注射干扰。

1.4 引物设计、基因克隆和测序

根据“1.3”9 条 *Mthl* 基因的相对表达量,确定以 *Mthl*-CL58C2 做 RNA 注射干扰研究,依据 *Mthl*-CL58C2 基因及其片段,利用 Premier Primer 5 软件设计基因特异引物,然后由上海生工生物公司合成(表 1)。全长扩增的 PCR 反应体系为 2×Es Taq MasterMix 12.5 μL、Forward primer(10 uM)1 μL、Reverse prime(10 uM)1 μL、c DNA 1 μL、RNase-free Water 补足至 25 μL。PCR 的反应程序均为:94℃ 2 min;94℃ 30 s;60℃ 40 s;72℃ 1 min 50 s,35 个循环;72℃ 10 min^[21]。PCR 产物经 1.0%琼脂糖凝胶电泳分离、2.0%琼脂糖凝胶切胶回收后,连接到 PMD^{18-T} 载体,转入到大肠杆菌 DH5α 感受态细胞中,在 LB 液体培养基上培养,PCR 筛选阳性克隆^[28]。阳性克隆菌液交上海生工

生物公司测序。

1.5 目标基因的 dsRNA 制备

根据已经克隆出来的各基因片段设计干扰引物,并在引物 5’端加上 T7 噬菌体启动子,用插有目的基因片段序列的质粒为模板,经两次扩增后,进行产物胶回收,回收 400 bp 左右的片段。采用 T7 RiboMAXTM Express RNAi System(Promega, USA)试剂盒,按以下反应体系在 1.5 mL 离心管中合成 dsRNA^[29]。

正/反义链 ssRNA 合成模板反应体系:Plasmid (containg target DNA), 2 μL;Rprimer (10uM), 2 μL;2×Es Taq MasterMix,9.5 μL;ddH₂O 补足到体积为 50 μL^[10]。

合成 ssRNA 反应体系:RiboMaXTM Express T7 2×buffer,20 μL;正义/反义 tempelate,16 μL;Enayme Mix,T7 Express ,4 μL。经退火、纯化后

得到 dsRNA,用仪器 Nano-Drop2000 测定 dsRNA 浓度,存于-80℃保存备用^[30]。

1.6 样品处理

dsRNA 浓度设置及注射方法:参考张燕^[31]和 Claude R^[32]方法并有改进:即将合成的 dsRNA 用 DEPC 处理水稀释成 0.3、1.2、4.8 μg/μL 的 3 个浓度。先用 0 号昆虫针在花绒寄甲成虫腹部第 1 节中心轻轻扎 1 个小孔,再用微量注射仪从小孔中,与虫体呈 45°夹角,注射不同浓度的 dsRNA,注射量程调到 69 nL,分 3 下打入,注射过程缓慢,注射完停顿 1 min 后移出针头。

注射处理后取样:取刚羽化的雌、雄成虫,分为 5 组,每组 100 头,分别注射 0.3、1.2、4.8 μg/μL 浓度的 dsRNA,阴性对照注射 dsGFP,注射量均为 207 nL,空白对照不注射任何物质。在注射后第 1、2、3、4、5、6、7、12 天取样,每处理取 6 头,每 2 头为一个生物学重复,用液氮速冻后保存在-80℃冰箱备用。

取刚羽化的雌、雄成虫,分为 5 组,每组 50 头,分别注射 0.3、1.2、4.8 μg/μL 浓度的 dsRNA,阴性对照注射 dsGFP,注射量均为 207 nL,空白对照不注射任何物质,观察并记录成虫干扰前和干扰后 30 d 的体重变化及死亡率。

取刚羽化的雌、雄成虫,分为 5 组,每组 20 头,分别注射 0.3、1.2、4.8 μg/μL 浓度的 dsRNA,阴性对照注射 dsGFP,注射量均为 207 nL,空白对照不注射任何物质,将同一处理浓度下的雌雄放在一起饲养,每 5 对雌雄为一个重复,观察雌虫产卵情况。

1.7 实时荧光定量 PCR 分析及数据分析

采用实时荧光定量 PCR 检测目的基因的各处理及对照的相对表达量,内参基因选择 *EF-1α*^[34]。PCR 反应条件:95℃ 2 min;95℃ 30 s;60℃ 30 s;72℃ 40 s,40 个循环。溶解曲线的反应条件:65℃ 到 95℃,每升高 0.5℃停留 10 s。提取注射 dsRNA 后的各时间段的雌、雄成虫总 RNA,反转录成 cDNA。

根据实时荧光定量 PCR 测得数据,目标基因的相对表达量计算采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法(Ct 表示循环数), $\Delta\Delta Ct = (Ct_{(CL58C2)} - Ct_{(EF-1\alpha)})_{\text{试验组}} - (Ct_{(\text{空白})} - Ct_{(EF-1\alpha)})_{\text{对照组}}$ ^[34],但该方计算方法不能直观的反映出试验组相对于对照组基因表达量的变化率。因此,为准确的计算出试验组相对于对照组基因表达量的变化率,首先计算出试验组基因相对表达量 $2_X^{-\Delta\Delta Ct}$, $\Delta\Delta Ct = (Ct_{(CL58C2)} - Ct_{(EF-1\alpha)})_{\text{试验组}}$,及对照组基因相对表达量 $2_Y^{-\Delta\Delta Ct}$, $\Delta\Delta Ct = (Ct_{(\text{空白})} -$

$Ct_{(EF-1\alpha)})_{\text{对照组}}$;再按照 $Z = (2_X^{-\Delta\Delta Ct} - 2_Y^{-\Delta\Delta Ct}) / 2_Y^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算出试验组相对于对照组基因表达的变化率。最后使用 SPSS 20 进行显著性差异分析(Duncan, $n=3, P<0.01$ 或 0.05)^[35]。

2 结果与分析

2.1 3 条 *Mthl* 基因的注释与鉴定

用 Notepad Plus 软件在转录组数据库中进行关键词(*methuselah-like*, *mth-like* 或 *mthl*)检索分析,找到了 Unigene5825、Unigene17714、CL58C2 3 条未记录的 *mth-like* cDNA 片段。再使用 NCBI 上的 Blastx 在线工具对这 3 条花绒寄甲的基因进行比对、分析,发现 *Mthl*-Unigene17714 与花绒寄甲的 *Mth-like* 2-2 基因同源性最高(79%)。*Mthl*-CL58C2 与花绒寄甲的 *Mth-like* 2-2 基因同源性最高(73%)。*Mthl*-Unigene 5825 与赤拟谷盗的 *Mth-like* 11 基因同源性最高(40%)。

将 Unigene5825、Unigene17714、CL58C2 分别命名为 *Mth-like* 11、*Mth-like* 2-4、*Mth-like* 2-5,上传至基因库,获得登录号分别为 MH175212、MH175213、MH175214。使用 NCBI 中的 ORF finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/orf-finder.cgi>)工具,分析 *Mth-like* 11、*Mth-like* 2-4、*Mth-like* 2-5,发现该 3 条基因均有完整开放阅读框(表 2)。其中,*Mth-like* 11 开放阅读框为 1 916 bp,编码 638 个氨基酸;*Mth-like* 2-4 开放阅读框为 1 369 bp,编码 457 个氨基酸;*Mth-like* 2-5 开放阅读框为 1 451 bp,编码 483 个氨基酸。*Mth-like* 2-4 和 *Mth-like* 2-5 的蛋白质与 *Mth-like* 2-2 相同,这 3 条基因可能存在密切同源关系,或者属于不同的蛋白质亚基。

2.2 高表达 *Mthl* 基因筛选、dsRNA 合成

选取刚羽化的成虫,以 *EF-1α* 为内参,应用实时荧光定量 PCR 检测花绒寄甲成虫 9 条 *Mthl* 基因的表达量。结果表明,*Mth-like* 11 基因表达量最低,*Mth-like* 2-5 基因与其他 *Mthl* 基因相比表达量显著较高(表 3),因此,选择 *Mth-like* 2-5 为干扰基因。

在 *Mthl*-CL58C2 基因的保守区域设计引物,扩增出一段 400 bp 左右的片段为体外合成双链 RNA 的初始模板,割胶回收得到的 400 bp 左右的片段。然后,经 T7 引物扩增,合成得到 dsRNA 片段(图 1)。由图 1 可以看出,体外转录 dsRNA 获得明亮单一的条带,并且与预期片段大小一致,可以说明已经体外转录成功得到目的片段的 dsRNA。

表 2 花绒寄甲 *Mth-like* 基因序列 Blastx 鉴定结果
Table 2 Identification of *mth-like* of *D. helohoroides* with know proteins

基因名称	登录号	长度 /bp	与已知蛋白质的同源搜索				
			<i>E</i> 值	相似度/%	物种	蛋白名称	蛋白登录号
<i>Mth-like</i> 11	MH175212	2 764	1e-138	40	<i>Tribolium castaneum</i>	<i>Mth-like</i> 11	KYB27423. 1
<i>Mth-like</i> 2-4	MH175213	1 989	0. 0	79	<i>Dastarcus helophoroides</i>	<i>Mth-like</i> 2-2	ANB32480. 1
<i>Mth-like</i> 2-5	MH175214	1 720	0. 0	73	<i>Dastarcus helophoroides</i>	<i>Mth-like</i> 2-2	ANB32480. 1

表 3 花绒寄甲成虫 9 条 *Mthl* 基因的相对表达量

Table3 The relative expression of 9 *Mthl* genes
in adult of *D. helohoroides*

基因	基因相对表达量
<i>Mth-like</i> 1	0. 001 4±0. 000 1 f
<i>Mth-like</i> 2-1	0. 000 7±0. 000 1 f
<i>Mth-like</i> 2-2	0. 006 8±0. 000 2 d
<i>Mth-like</i> 2-3	0. 013 1±0. 000 9 c
<i>Mth-like</i> 5-1	0. 005 4±0. 000 3 de
<i>Mth-like</i> 5-2	0. 005 0±0. 000 2 e
<i>Mth-like</i> 11	0. 000 4±0. 000 1 f
<i>Mth-like</i> 2-4	0. 019 1±0. 001 0 b
<i>Mth-like</i> 2-5	0. 030 7±0. 000 2 a

注:数据为表达量平均值±标准差,字母不同表示每一列数据差异显著($P<0.05$)。下同。

2.3 注射 dsRNA 对 *Mth-like2-5* 的表达及对虫体发育的影响

2.3.1 注射 dsRNA 后 *Mth-like2-5* 表达量及其变化规律 花绒寄甲成虫注射 *Mth-like2-5* 的 dsRNA 后,*Mth-like2-5* 表达量显著降低,总变化趋势是 dsRNA 注射浓度越高 *Mth-like2-5* 表达量越低(表 4、表 5)。雄成虫注射 dsRNA 后,第 1、第 12 天 *Mth-like2-5* 下调表达,但注射 0. 3、1. 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的 dsRNA 处理组在第 2~7 天表现出了应激上调高表达。雌成虫注射 dsRNA 后,*Mth-like2-5* 表达量低于雄成虫,第 1、4、12 天 *Mth-like2-5* 下调表达,但

表 4 在 dsRNA 干扰下花绒寄甲雄成虫 *Mth-like2-5* 基因的相对表达量

Table 4 Relative expression of *mth-like2-5* gene under the interference of dsRNA in the males adult of *D. helohoroides*

处理时间/d	雄虫注射浓度/($\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$)			
	0. 3	1. 2	4. 8	dsGFP
1	(0. 318 0±0. 021 9)j	(0. 179 8±0. 016 9)klm	(0. 100 2±0. 010 0)mn	(0. 855 6±0. 006 9)a
2	(0. 720 7±0. 017 3)bcd	(0. 173 1±0. 027 8)klmn	(0. 129 9±0. 009 9)klmn	(0. 724 6±0. 036 2)bcd
3	(0. 512 9±0. 043 0)fg	(0. 302 7±0. 035 0)j	(0. 171 0±0. 001 0)klmn	(0. 708 2±0. 012 8)bcd
4	(0. 549 2±0. 020 8)f	(0. 405 2±0. 001 6)hi	(0. 207 2±0. 022 7)kl	(0. 746 1±0. 017 9)bc
5	(0. 579 0±0. 003 5)ef	(0. 326 4±0. 067 5)ij	(0. 202 4±0. 032 9)kl	(0. 648 3±0. 020 8)de
6	(0. 642 2±0. 064 0)de	(0. 444 1±0. 060 9)gh	(0. 097 9±0. 000 8)mn	(0. 692 4±0. 056 3)cd
7	(0. 796 8±0. 068 4)ab	(0. 417 7±0. 032 5)h	(0. 085 0±0. 011 5)no	(0. 770 3±0. 006 4)bc
12	(0. 437 3±0. 003 5)gh	(0. 219 9±0. 020 3)k	(0. 124 5±0. 011 7)lmn	(0. 713 0±0. 027 0)bcd

雌成虫 0. 3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 处理组 *Mth-like2-5* 表达量在第 1~3 天抑制程度逐渐增大,在第 4~12 天呈现明显的应激上调表达反应。1. 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 和 4. 8 $\mu\text{g}/$

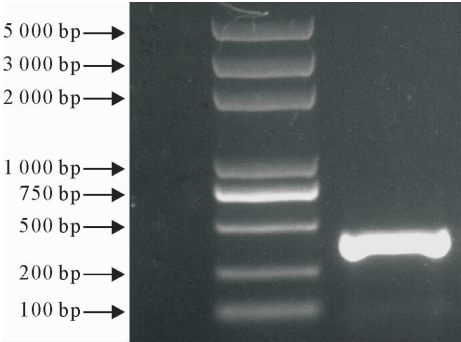


图 1 花绒寄甲成虫 *Mth-like2-5* 的 dsRNA 初始模板电泳图
Fig. 1 Initial template dsRNA electrophoresis of the *mth-like 2-5* gene in adult of *D. helohoroides* left is the DNA Mark, right is dsRNA

在第 2~3 天和第 5~7 天表现出了应激上调高表达。这一现象说明,dsRNA 干扰 *Mth-like2-5* 表达量,干扰后雄成虫表达量小于雌成虫,但在干扰过程中雌雄虫均具有应激表达反应。

2.3.2 注射 dsRNA 后 *Mth-like2-5* 表达量的变化率 与对照相比较,雄成虫 *Mth-like2-5* 表达量变化率虽然在第 12 天均被抑制,但在第 2~7 天具有明显的应激反应趋势。其中,0. 3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 处理组在第 1~7 天表达水平被抑制率有逐渐降低趋势,1. 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 处理组降低-34%~-80%,4. 8 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 处理组降低-69%~-89%,(图 2)。

μL 处理组表达量变化率呈现逐渐负增长趋势。但抑制率分别为-9%~-77%,-31%~-81%(图 3)。

表达量变化率说明,随 dsRNA 注射浓度增大,花绒寄甲雌雄成虫 *Mth-like2-5* 表达水平被抑制程度越大,雄成虫被抑制程度大于雌成虫,低浓度的 dsRNA 难以抑制雌成虫 *Mth-like2-5* 的表达。

表 5 在 dsRNA 干扰下花绒寄甲雌成虫 *Mth-like2-5* 基因的相对表达量

Table 5 Relative expression of <i>mth-like2-5</i> gene under the interference of dsRNA in the females adult of <i>D. helohoroides</i>				
处理时间/d	雌虫注射浓度/($\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$)			
	0.3	1.2	4.8	dsGFP
1	(0.569 6 \pm 0.026 2)ef	(0.341 0 \pm 0.018 6)fghi	(0.258 9 \pm 0.017 6)hijkl	(0.376 6 \pm 0.010 5)fg
2	(0.679 8 \pm 0.064 6)cde	(0.273 7 \pm 0.023 9)hijkl	(0.288 3 \pm 0.023 2)hijkl	(0.631 0 \pm 0.054 1)def
3	(0.787 8 \pm 0.050 4)bcd	(0.168 6 \pm 0.006 1)klm	(0.261 3 \pm 0.013 6)hijkl	(0.629 0 \pm 0.176 2)def
4	(0.480 9 \pm 0.025 0)fg	(0.226 4 \pm 0.019 1)hijkl	(0.294 6 \pm 0.004 8)hijkl	(0.992 1 \pm 0.049 6)a
5	(0.860 2 \pm 0.081 1)ab	(0.230 3 \pm 0.013 8)hijkl	(0.201 4 \pm 0.011 5)hijkl	(1.005 6 \pm 0.030 9)a
6	(0.882 7 \pm 0.003 5)ab	(0.354 8 \pm 0.058 7)ghi	(0.224 4 \pm 0.011 8)hijkl	(0.734 7 \pm 0.110 9)bcd
7	(0.637 4 \pm 0.031 7)def	(0.209 3 \pm 0.022 3)hijkl	(0.144 6 \pm 0.033 6)lm	(0.799 7 \pm 0.203 1)bc
12	(0.486 3 \pm 0.002 0)fg	(0.323 9 \pm 0.025 2)hijk	(0.173 7 \pm 0.015 5)jklm	(0.822 3 \pm 0.125 0)bc

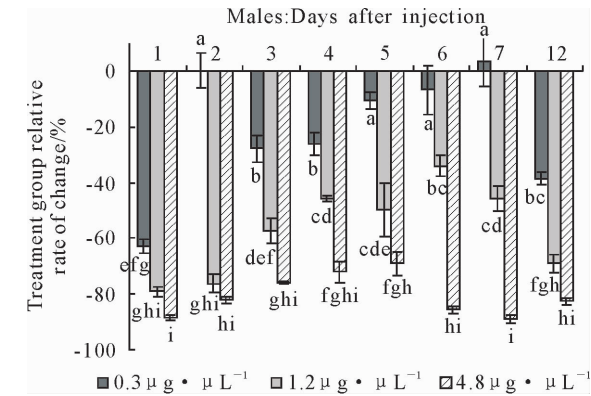


图 2 花绒寄甲雄成虫注射 dsRNA 后 *Mth-like2-5* 基因相对表达量变化率

Fig. 2 Relative expression of *mth-like2-5* gene under the interference of dsRNA in the males adult of *D. helohoroides*

2.3.3 注射 dsRNA 后成虫的产卵、体重和存活率

将注射 *Mth-like 2-5* 基因 dsRNA 相同浓度的雌雄虫放在一起饲养表明,注射 dsGFP 的对照组在第 31 天开始产卵,注射 0.3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 和 1.2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ dsRNA 处理组雌虫在第 36 天开始产卵,4.8 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ dsRNA 处理组雌虫至第 90 天仍未见产卵,0.3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 和 1.2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ dsRNA 处理组和对照组在第 90 天仍产卵。这一情况说明,*Mth-like 2-5* 基因可能参与调控花绒寄甲的生殖过程,或者直接参与调控雌虫体内卵的发育。

在干扰后 12 d,与对照组相比,dsRNA 干扰处理浓度越高,成虫体重减少量越明显,死亡率越高。但雌、雄虫间的差异不显著,未注射 dsRNA 组与注射 dsGFP 组的体重变化量相近(图 4)。

花绒寄甲成虫在注射 *Mth-like 2-5* 基因 dsRNA、dsGFP 和不注射的空白对照的存活率变化有明显差异(图 5)。其中,雌雄虫的空白对照组的存活率下降不明显。注射 dsGFP 处理组存活率下降的较快,表明注射过程对虫体造成一定的机械损伤,

说明注射 dsGFP 对成虫的存活率有一定影响。注射不同浓度 dsRNA 成虫的存活率显著降低,注射浓度越高存活率越低,说明沉默 *Mth-like 2-5* 基因对花绒寄甲的存活有明显的影响,雌成虫的存活率相对高于雄成虫。3 种注射 dsRNA 浓度相对比,1.2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ dsRNA 注射量既能降低花绒寄甲 *Mth-like 2-5* 基因的表达量,又能保证注射后有相对较高的存活率。

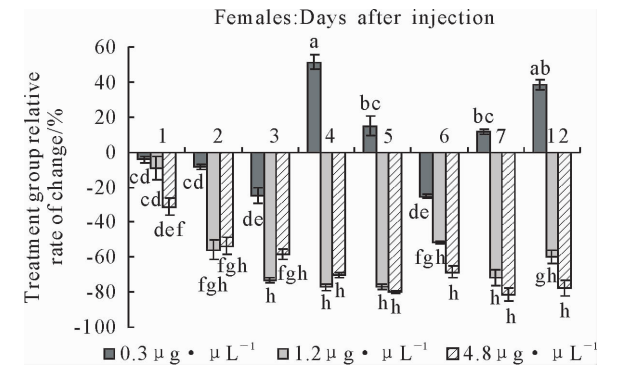


图 3 花绒寄甲雌成虫注射 dsRNA 后 *Mth-like2-5* 基因相对表达量变化率

Fig. 3 Relative expression of *mth-like2-5* gene under the interference of dsRNA in the females adult of *D. helohoroides*

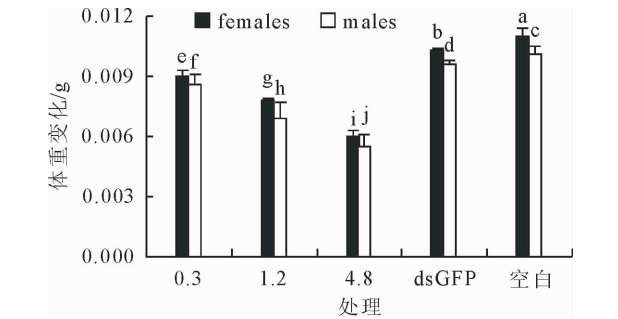
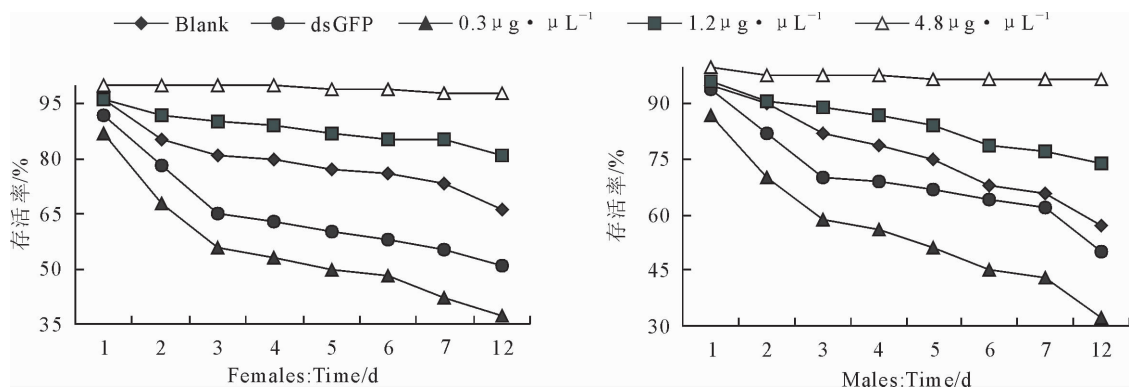


图 4 花绒寄甲成虫在 dsRNA 干扰下体重的变化
Fig. 4 Changes in adult body weight under dsRNA interference of *D. helohoroides*



注: 1-blank, 2-dsGFP, 3-0.3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 4-1.2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 5-4.8 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。

图 5 注射 dsRNA 后花绒寄甲成虫存活率的变化

Fig. 5 Adult survival rate of *D. helophoroides* after injection dsRNA

3 结论与讨论

从花绒寄甲转录组数据库中分别鉴定出 *Mth-like* 11、*Mth-like* 2-4、*Mth-like* 2-5 基因(登录号分别为 MH175212、MH175213、MH175214), 将花绒寄甲的 *Mthl* 基因由原来的 6 条增加至 9 条^[27], 由于 *Mth-like* 2-4 和 *Mth-like* 2-5 与已报道的 *Mth-like* 2-2 蛋白质相同, 因此这 3 条基因可能是同源基因, 或者属于不同的蛋白质亚基^[36]。

利用 *Mth-like* 2-5 基因 dsRNA 片段, 采用注射法对花绒寄甲 *Mth-like* 2-5 基因进行干扰, dsRNA 能显著干扰 *Mth-like* 2-5 的表达, 干扰后雄成虫表达量低于雌成虫, 但在干扰过程中雌雄虫均具有应激表达反应。表达量变化率说明, dsRNA 对雄成虫 *Mth-like* 2-5 的表达抑制程度大于雌成虫; 随 dsRNA 注射浓度增大, 雌雄成虫 *Mth-like* 2-5 表达水平被抑制程度越大, 低浓度的 dsRNA 难以抑制雌成虫 *Mth-like* 2-5 的表达。文献报道^[8], 较低浓度 dsRNA 对目标基因的干扰效果较缓慢, 沉默效果不明显, 可引起虫体的应激反应; 这一现象也存在于花绒寄甲 *Mth-like* 2-5 基因干扰后的表达反应中。

在本研究中, 随 dsRNA 注射浓度增大和处理后时间的延长, 花绒寄甲雌雄成虫体重明显降低, 死亡率增高, 但雌虫的表达量明显大于雄虫; 0.3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 和 1.2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ dsRNA 低浓度处理组雌成虫推迟产卵期, 4.8 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ dsRNA 高浓度处理组雌虫不能产卵。Li C 采用注射 dsRNA 干扰赤拟谷盗 5 条 *mthl*, 同样也发现 dsRNA 可引起雌虫生育能力明显下降^[8]。由于 dsRNA 使花绒寄甲 *Mth-like* 2-5 基因表达受到抑制, 雌雄成虫体重下降、寿命缩短、死亡加速, 雌成虫不能正常产卵, 但雌成虫体重、寿命仍大于雄成虫, 而死亡率小于雄成虫。dsRNA 对该基因正常表达和转录的影响, 可能加速了物质代

谢或营养转化, 使虫体内物质持续过量消耗、衰老加速, 最终导致虫体重下降、寿命缩短和死亡加速。同时, dsRNA 最终导致物质代谢或营养转化机制异常, 使雌成虫卵及卵巢发育营养供给不足、产卵期推迟或难以产卵。但 *Mth-like* 2-5 基因是否参与调控物质代谢或营养转化机制, 或直接与调控卵的发育, 还需要进一步研究。

文献报道^[37], dsRNA 长度及浓度是影响 RNAi 效果的重要因素, 在一些昆虫和植物的研究中发现长度 >200 bp 的 dsRNA 在抑制特定基因的表达上效果更好。Whyard 报道在果蝇的细胞周期素 E 基因的 RNAi 中, 540 bp 和 400 bp 长度的 dsRNA 非常有效, 200 bp 和 300 bp 长度的 dsRNA 效果较差; 在果蝇的胚胎中, 长片段(400 bp)的双链 RNA 的干扰效果(86%)比短片段(21 bp)的 siRNA(19%~24%)明显^[38]。在果蝇的 S2 细胞系中长片段 dsRNA 对目标 RNA 干扰效果较好^[39], 但在草地贪夜蛾的 Sf21 细胞系中, 短片段的 siRNA 对目标 RNA 干扰效果较好^[30]。这说明物种和目标 RNA 不同, 干扰时对 dsRNA 的长度要求不同。本研究目标基因是花绒寄甲 *Mth-like* 2-5, 该基因开放阅读框为 1 451 bp, 在 RNAi 使用的 dsRNA 长度约 400 bp, 获得了较好的干扰效果。

研究对象和目的基因不同, dsRNA 的有效作用剂量差别很大^[40]。Jaubert-Possamai 报道, 对豌豆蚜的 *calreticulin* 基因进行干扰, 每头蚜虫注射 46 nL 的 siRNA(6 ng/ μL)处理的死亡率显著高于注射 5 nL 的处理^[41]; 文献报道赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* 所需降低目标基因转录水平的 dsRNA 低至 5 pg^[42], 沉默家蚕 *Bombyx mori* 的 *bursicon* 基因所需的 dsRNA 剂量则高达 20 μg ^[43]。dsRNA 在昆虫体内的稳定性也会影响 RNAi 的效率, 如 Terenius 发现 dsRNA 可被昆虫体内的核酸酶所降

解,降解家蚕 dsRNA 的降解酶 Bm_{ds} RNase 能在家蚕 Bm5 细胞中表达,进而影响 RNAi 的效率^[44]。此外,dsRNA 除对目标 RNA 产生干扰反应外^[45],也会影响研究对象的免疫反应及免疫基因的表达,从而降低 RNA 干扰的效率^[46-47]。本研究中,对花绒寄甲成虫注射 0.3、1.2 μg/μL 和 4.8 μg/μL 的 dsRNA,虽然均能产生干扰效果,但低浓度 dsRNA 对 *Mth-like* 2-5 的干扰效果差、应激表达反应明显,高浓度 dsRNA 干扰效果显著但引起的死亡率也较高,注射 1.2 μg/μL 中等浓度 dsRNA 对目标基因有显著的干扰效果、应激表达反应较低、引起的死亡率较小,因此后续研究中应使用 1.2 μg/μL 的注射浓度。但干扰过程中出现的应激表达反应,是由 dsRNA 在花绒寄甲体内降解或者免疫反应所引起还有待研究。此外,文献报道花绒寄甲具有 1 条调控生长发育因子即雌激素相关受体 ERR,具有 5 条调控神经元发生、肌细胞和血细胞生成、性别决定和肠组织发育转录因子 bHLH^[48],*Mth-like* 2-5 与 ERR 及 bHLH 之间的关系也待研究。

参考文献:

[1] 张正红,张儒.果蝇长寿基因 methuselah 的研究进展[J].昆虫学报,2012,55(12):1394-1398.
ZHANG Z H,ZHANG R. Research progress on the longevity gene methuselah in *Drosophila*[J]. Acta Entomologica Sinica, 2012,55(12):1394-1398. (in Chinese)

[2] WALLENFANG M R,NAYAK R,DINARDO S. Dynamics of the male germline stem cell population during aging of *Drosophila melanogaster*[J]. Aging Cell,2006,5(4):297-304.

[3] PETROSYAN A,HSIEH I H,SABERI K. Age-dependent stability of sensorimotor functions in the life-extended *Drosophila*,mutant methuselah[J]. Behavior Genetics,2007,37(4):585-594.

[4] LIN Y J,SEROUDE L,BENZER S. Extended life-span and stress resistance in the *Drosophila* mutant methuselah[J]. Science,1998,282 (5390):943-946.

[5] SONG W,RANJAN R,DAWSON-SCULLY K,et al. Presynaptic regulation of neurotransmission in *Drosophila* by the g protein-coupled receptor methuselah[J]. Neuron,2002,36(1):105.

[6] PATEL M V,HALLAL D A,JONES J W,et al. Dramatic expansion and developmental expression diversification of the methuselah gene family during recent *Drosophila* evolution [J]. Journal of Experimental Zoology Part B Molecular & Developmental Evolution,2012,318(5):368.

[7] LI C,ZHANG Y,YUN X,et al. Methuselah-like genes affect development, stress resistance, lifespan and reproduction in *Tribolium castaneum*[J]. Insect Molecular Biology,2014,23 (5):587.

[8] LI C,CHEN M,SANG M,et al. Comparative genomic analysis and evolution of family-B G protein-coupled receptors from six

model insect species[J]. Gene,2013,519(1):1.

[9] DE M A,JONES J W,FRIEDRICH M. *Methuselah/Methuselah-like* G protein-coupled receptors constitute an ancient metazoan gene family[J]. Scientific Reports,2016,6(21801).

[10] FIRE A,XU S,MONTGOMERY M K,et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*[J]. Nature,1998,391(6669):806.

[11] BELLES X. Beyond drosophila:RNAi in vivo and functional genomics in insects[J]. Annual Review of Entomology,2010,55(55):111.

[12] 高晓飞,包晶晶,陈勇军,等. 利用 RNA 干扰机制抑制猪繁殖与呼吸综合征病毒的增殖[J]. 中国病毒学,2006,21(3):226-230.
GAO X F,BAO J J,CHEN Y J,et al. RNA interference inhibits replication of porcine reproductive and respiratory syndrome virus[J]. Virologica Sinica,2006,21(3):226-230. (in Chinese)

[13] 岳建苏. 桔小实蝇钠离子通道基因和 P450 基因 RNAi 载体构建及对柑橘的转化[D]. 成都:西南大学,2014.

[14] BAUM JA,BOGAERT T,CLINTON W,et al. Control of coleopteran insect pests through RNA interference[J]. Nat. Biotech.,2007,25(11):1322-1326.

[15] MAO Y B,CAI W J,WANG J W,et al. Silencing a cotton bollworm P450 monooxygenase gene by plant-mediated RNAi impairs larval tolerance of gossypol[J]. Nature Biotechnology,2007,25(11):1307-1313.

[16] HUNTER W,ELLIS J,ENGELSDORP D,et al. Large-scale field application of RNAi technology reducing israeli acute paralysis virus disease in honey bees (*Apis mellifera*,Hymenoptera:Apidae)[J]. PLo S Pathog,2010,6(12):e1001160.

[17] MAO Y B,TAO X Y,XUE X Y,et al. Cotton plants expressing CYP6AE14,double-stranded RNA show enhanced resistance to bollworms[J]. Transgenic Research,2011,20(3):665-673(9).

[18] 秦瑞豪,李孟楼,张翌楠,等. 花绒寄甲防治松褐天牛最佳释放条件的筛选[J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版,2012,40(2):92-96.
QIN R H,LI M L,ZHANG Y N,et al. Screening for the release conditions of *Dastarcus helophoroides* to control *Monochamus alternatus*[J]. Journal of Northwest A&F University:Nat. Sci. Ed.,2012,40(2):92-96. (in Chinese)

[19] 雷琼,李孟楼,杨忠歧. 花绒寄甲的生物学特性研究[J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版,2003,31(2):62-66.
LEI Q,LI M L,YANG Z Q. A study on biological feature of *Dastarcus longulus*[J]. Journal of Northwest Sci-Tech University of A&F:Nat. Sci. Ed.,2003,31(2):62-66. (in Chinese)

[20] 李孟楼,李有忠,雷琼,等. 释放花绒寄甲卵对光肩星天牛幼虫的防治效果[J]. 林业科学,2009,45(4):78-82 .
LI M L,LI Y Z,LEI Q,et al. Biocontrol of Asian longhorned beetle larva by releasing eggs of *Dastarcus helophoroides* (Coleoptera:Bothrideridea)[J]Scientia Silvae Sinicae,2009,45(4):78-82. (in Chinese)

[21] 李孟楼,王培新,马峰,等. 花绒寄甲对光肩星天牛的寄生效果研究[J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版,2007,35(6):

152-162.

LI M L, WANG P X, MA F, *et al.* Study on the parasitic efficiency of *Dastarcus helophoroides* on *Anoplophora glabripennis*[J]. Journal of Northwest A&F University: Natural Science Edition, 2007, 35(6): 152-162. (in Chinese)

[22] WANG H D, LI F F, HE C, *et al.* Molecular cloning and sequence analysis of novel Cytochrome P450 cDNA fragments from *Dastarcus helophoroides*[J]. Journal of Insect Science, 2014, 14(28): 415-422.

[23] 王海东. 花绒寄甲 P450 基因的分子克隆与表达[D]. 杨陵: 西北农林科技大学, 2013.

[24] 郭瑞坚. 花绒寄甲抗氧化酶基因表达研究[D]. 杨陵: 西北农林科技大学, 2015.

[25] 王化鹏, 郝春风, 张正青, 等. 花绒寄甲 methuselah-like 基因的鉴定和表达[J]. 东北林业大学学报, 2016, 44(7): 102-107.

WANG H P, HAO C F, ZHANG Z Q, *et al.* Identification and expression of *Methuselah-like* gene in *Dastarcus helophoroides*[J]. Journal of Northeast Forestry University, 2016, 44(7): 102-107. (in Chinese)

[26] ZHANG W, SONG W, ZHANG Z, *et al.* Transcriptome analysis of *Dastarcus helophoroides* (Coleoptera: Bothriidae) using illumina hiseq sequencing[J]. Plos One, 2014, 9(9): e100673.

[27] ZHANG Z, WANG H, HAO C, *et al.* Identification, characterization and expression of *Methuselah-like* genes in *Dastarcus helophoroides* (Coleoptera: Bothriidae) [J]. Genes, 2016, 7(10): 91.

[28] 田宏刚. 利用饲喂法 RNAi 研究昆虫生长发育相关基因的功能[D]. 中山: 中山大学, 2009.

[29] BULOW S, ZAMMATTEO N, REMACLE J. Gene-related RNAi transfection method; EP, US20050059019[P]. 2005.

[30] STÉPHANIE J P, LE T G, JOËL B, *et al.* Gene knockdown by RNAi in the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*[J]. Bmc Biotechnology, 2007, 7(1): 63.

[31] 张燕. 利用 RNA 干扰技术研究豌豆蚜唾液腺基因的功能[D]. 济南: 山东农业大学, 2012.

[32] CLAUDE R, CHRISTOPHIDES G K, JOËL B, *et al.* Gene knockdown by RNAi in the pea aphid *Acyrtosiphon pisum* [J]. Bmc Biotechnology, 2007, 7(1): 63.

[33] 宋旺, 王小纪, 郭瑞坚, 等. 花绒寄甲荧光定量 PCR 分析中内参基因的选择[J]. 西北农业学报, 2015, 24(2): 156-161.

SONG W, WANG X J, GUO R J, *et al.* Selection of reference genes for quantitative real-time PCR normalization in *Dastarcus helophoroides*[J]. Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica, 2015, 24(2): 156-161. (in Chinese)

[34] SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C (T)) Method[J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.

[35] ZHANG R, GAO G, CHEN H. Silencing of the olfactory co-receptor gene in *Dendroctonus armandi* leads to EAG response declining to major host volatiles[J]. Scientific Reports, 2016, 6: 231-236.

[36] PAABY A B, SCHMIDT P S. Functional significance of allelic variation at methuselah, an aging gene in *Drosophila*[J]. Plos One, 2008, 3(4): e1987.

[37] NICHOLSON R H, NICHOLSON A W. Molecular characterization of a mouse cDNA encoding dicer, a ribonuclease III ortholog involved in RNA interference. [J]. Mammalian Genome, 2002, 13(2): 67.

[38] WHYARD S, SINGH A D, WONG S. Ingested double-stranded RNAs can act as species-specific insecticides[J]. Insect Biochemistry & Molecular Biology, 2009, 39(11): 824-832.

[39] SALEH M C, RIJ R P V, HEKELE A, *et al.* The endocytic pathway mediates cell entry of dsRNA to induce RNAi silencing[J]. Nature Cell Biology, 2006, 8(8): 793-802.

[40] ZHUANG S, KELO L, NARDI J B, *et al.* Multiple α , subunits of integrin are involved in cell-mediated responses of the manduca, immune system[J]. Developmental & Comparative Immunology, 2008, 32(4): 365-379.

[41] CLAUDE R, CHRISTOPHIDES G K, JOËL B, *et al.* Gene knockdown by RNAi in the pea aphid *Acyrtosiphon pisum* [J]. Bmc Biotechnology, 2007, 7(1): 63.

[42] TOMOYASU Y, DENELL R E. Larval RNAi in *Tribolium* (Coleoptera) for analyzing adult development[J]. Development Genes & Evolution, 2004, 214(11): 575.

[43] HUANG J, ZHANG Y M, WANG S, *et al.* RNA interference-mediated silencing of the bursicon gene induces defects in wing expansion of silkworm[J]. Febs Letters, 2007, 581(4): 697-701.

[44] TEREINIUS O, PAPANICOLAOU A, GARBUTT J S, *et al.* RNA interference in Lepidoptera: an overview of successful and unsuccessful studies and implications for experimental design. [J]. Journal of Insect Physiology, 2011, 57(2): 231-45.

[45] LIU J, SWEVERS L, IATROU K, *et al.* Bombyx mori DNA/ RNA non-specific nuclease: expression of isoforms in insect culture cells, subcellular localization and functional assays[J]. Journal of Insect Physiology, 2012, 58(8): 1166.

[46] LIU J, SMAGGHE G, SWEVERS L. Transcriptional response of BmToll9-1 and RNAi machinery genes to exogenous dsRNA in the midgut of *Bombyx mori* [J]. Journal of Insect Physiology, 2013, 59(6): 646.

[47] LIU J, KOLLIPOULOU A, SMAGGHE G, *et al.* Modulation of the transcriptional response of innate immune and RNAi genes upon exposure to dsRNA and LPS in silkworm-derived Bm5 cells overexpressing BmToll9-1 receptor [J]. Journal of Insect Physiology, 2014, 66(3): 10.

[48] 张正青, 李孟楼. 花绒寄甲 *ERR* 和 *bHLH* 基因筛选与序列分析[J]. 西北林学院学报, 2016, 31(6): 190-196.

ZHANG Z Q, LI M L. Identification and sequence analysis of *ERR* and *bHLH* Gene in *Dastarcus helophoroides* transcriptome[J]. Journal of Northwest Forestry University, 2016, 31(6): 190-196. (in Chinese)