

网络出版时间:2015-03-12 14:17

DOI:10.13207/j.cnki.jnwfufu.2015.04.017

网络出版地址:http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20150312.1417.017.html

拟黑多刺蚁 *hsp90* 基因的 RNA 干扰及其对 *EcR* 和 *USP* 基因 mRNA 表达的影响

樊瑾瑛,应琼琼,党 亮,奚耕思

(陕西师范大学 生命科学学院,动物生殖与发育实验室,陕西 西安 710062)

【摘 要】 【目的】对拟黑多刺蚁(*Polyrhachis vicina* Roger)成虫热激蛋白 90(Heat shock protein 90, HSP90)基因进行 RNA 干扰(RNAi),为分析 *hsp90* 基因的功能及将 RNAi 技术用于害虫防治提供参考。【方法】采用 Trizol 法提取拟黑多刺蚁总 RNA,反转录合成 cDNA 第一链用于 *hsp90* 基因的克隆。利用 T7 RiboMAX™ Express RNAi System 将 *hsp90* 合成双链 RNA(double-stranded RNA, dsRNA),将其配制成 120, 60, 30, 15 和 7.5 ng/ μ L 的溶液饲喂拟黑多刺蚁雌蚁、雄蚁和工蚁成虫进行 RNAi,共饲喂 14 d,记录成虫死亡率,确定 dsRNA 最适质量浓度,并以此剂量对各品级成虫进行干扰,通过荧光实时定量 PCR,检测干扰效果及干扰 *hsp90* 基因对 *EcR*、*USP* mRNA 表达的影响。【结果】成功获得拟黑多刺蚁 *hsp90* 基因片段,其长度 523 bp,并合成了 dsRNA。饲喂 dsRNA 后发现,dsRNA 质量浓度越大,拟黑多刺蚁死亡率越高,在 dsRNA 质量浓度为 120 ng/ μ L 时,饲喂 5 d 后成虫全部死亡;30 ng/ μ L 是 dsRNA 干扰的最适质量浓度。以 30 ng/ μ L dsRNA 干扰后,荧光实时定量 PCR 结果表明,拟黑多刺蚁每个品级成虫 *hsp90* 基因 mRNA 均被沉默。*hsp90* 基因被干扰后,*EcR* 的表达没有显著变化,*USP* 的表达显著降低。【结论】采用饲喂法成功干扰了拟黑多刺蚁 *hsp90* 基因 mRNA 的表达;*hsp90* 基因与 *USP* 基因表达有一定的相关性。

【关键词】 热激蛋白 90 基因;RNA 干扰;蜕皮激素受体;超气孔蛋白

【中图分类号】 Q966

【文献标志码】 A

【文章编号】 1671-9387(2015)04-0191-06

RNA interference effect of *hsp90* gene and impacting on the mRNA expression of *EcR* and *USP* genes in *Polyrhachis vicina* Roger

FAN Jin-ying, YING Qiong-qiong, DANG Liang, XI Geng-si

(Laboratory of Animal Reproduction and Development, College of Life Science, Shaanxi Normal University, Xi'an, Shaanxi 710062, China)

Abstract: 【Objective】 This paper involve the function of *hsp90* gene in *Polyrhachis vicina* Roger by using RNA interference technology, and provide the reference for the prevention and control of pests. 【Method】 The total RNA was extracted by Trizol, reverse transcription synthetic cDNA first chain used for *hsp90* gene cloning, double strand RNA (dsRNA) of *hsp90* gene was synthesized by T7 RiboMAX™ Express RNAi System and the ants including female, male and workers were fed by dsRNA at 120, 60, 30, 15 and 7.5 ng/ μ L in 14 days. The adult mortalities were recorded, the most suitable dsRNA concentration was confirmed, and all grade of adults was taken by this dose interferece. The interference effect and interference *hsp90* gene effecting *EcR* as well as *USP* mRNA expression was detected by fluorescent real-time quantitative RT-PCR. 【Result】 *P. vicina* *hsp90* dsRNA was gotten by the synthesis according to *hsp90* gene of fragment length 523 bp dsRNA was fed to *P. vicina* ants, the mortality increased along with the in-

【收稿日期】 2013-10-22

【基金项目】 国家自然科学基金面上项目(31171195)

【作者简介】 樊瑾瑛(1988—),女,陕西渭南人,在读硕士,主要从事动物生殖和发育研究。E-mail: fgy933@126.com

【通信作者】 奚耕思(1956—),女,上海浦东人,教授,博士生导师,主要从事动物生殖和发育研究。E-mail: xigengsi@snnu.edu.cn

creased dsRNA concentration, *P. vicina* ants were all died in 120 ng/ μ L in 5 days. 30 ng/ μ L maybe a appropriate choice. Under condition of 30 ng/ μ L, total RNA was extracted, the analysis of Florescent real-time quantitative RT-PCR indicates hsp90 mRNA of *P. vicina* ants were suppressed in all grades. There are no significant change in the expression of *EcR* mRNA of *P. vicina* and an obvious decrease of USP mRNA of *P. vicina* after interfering hsp90. 【Conclusion】 The interference of hsp90 has been achieved successfully as firstly, and preliminary analyze indicates that a correlation may be existed between hsp90 and USP.

Key words: heat shock protein 90 gene; RNA interference; ecdysone receptor; ultraspiracle protein

热激蛋白(Heat shock protein, HSP)最早是由 Ritossa 在果蝇的粗线染色体上发现的。热激蛋白是一类应激蛋白,当生物体处于高温、低氧或紫外线照射等条件下,其表达量都会急剧增加^[1-2]。热激蛋白主要有 5 类:HSP100、HSP90、HSP70、HSP60 及小分子 sHSP^[3-4]。昆虫体内的热激蛋白不仅与昆虫的耐热性有关,还与昆虫的发育有重要的关系^[5]。Huang 等^[3]克隆了斑潜蝇的 3 种小分子 hsp (*hsp19.5*、*hsp20.8* 和 *hsp21.7*) 和 2 种 *hsp60* (*TCP1A*、*TCP1F*) 基因,发现其总的表达趋势是:小分子 hsp 在蛹期表达量最高,而大分子 *hsp60* 的表达量则随着生长发育的进行而递增,说明热激蛋白不仅与生长发育相关,还参与了昆虫的变态行为。用注射法干扰赤拟谷盗第 6 龄期幼虫体内的 *hsp90* 基因后,这些幼虫的发育将停留在蛹前阶段,不能形成正常的复眼^[6]。

对果蝇的研究证明,HSP70 和 HSP90 参与了蜕皮激素信号转导^[7-8]。在果蝇蜕皮激素信号转导中,HSP70、HSP90 及钙调蛋白同源域 64(Calponin homology domain64, Chd64)等辅助因子与蜕皮激素受体(Estrogen receptor-related receptor, EcR)和超气孔蛋白(Ultraspiracle Protein, USP)形成的异源二聚体相互作用,从而激活 EcR/USP 和 DNA 的结合活性,HSP90 对于蜕皮激素受体的激活具有必不可少的作用^[4,9]。

RNA 干扰(RNAi)指将双链 RNA(dsRNA)导入细胞后,引起与 dsRNA 互补的内源性 mRNA 特异性降解,导致此 mRNA 编码的基因不表达,发生基因沉默的现象^[10]。昆虫 RNAi 的研究发展迅速,技术也日趋成熟。将 dsRNA 导入昆虫的方法主要有注射法、饲喂法以及组织培养法等^[11],其中饲喂法是目前应用较多一种方法,此种方法通过饲喂能够表达 dsRNA 的菌株或人工饲料,使昆虫连续摄入 dsRNA,从而达到有效抑制靶基因表达的目的^[12]。这种方法在多种昆虫中被证明是可行的^[13]。

HSP90 参与昆虫由蜕皮激素介导的信号通路,

关于这方面的研究仅在果蝇、棉铃虫等少数昆虫中有报道^[7,9],而对于具有品级分化的社会性昆虫拟黑多刺蚁,HSP90 是否与 EcR 和 USP 存在相关性,还未见有报道。鉴于此,本试验采用 dsRNA 饲喂方法,对拟黑多刺蚁 3 个品级成虫进行 *hsp90* 基因表达干扰,确定最适 dsRNA 干扰量,并利用荧光实时定量 PCR 方法,分析 dsRNA 对各品级成虫 *hsp90*、*EcR* 和 *USP* 基因 mRNA 水平表达量的影响,以期深入了解 *hsp90* 基因的功能,同时为将 RNAi 应用于害虫防治提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试昆虫 拟黑多刺蚁购自浙江温州瑞丰蚂蚁工坊。购回后,在实验室内以新鲜肉类、瓜果、蜂蜜以及冰糖等进行人工喂养,饲养温度为 18~35℃,湿度为 30%~40%。

1.1.2 主要试剂 Trizol 试剂、SuperScript™ First Strand Synthesis 试剂盒, Taq 酶、dNTP 均购自 Takara 公司; T7 RiboMAX™ Express RNA System 由 Promega 公司提供;琼脂糖 DNA 凝胶回收试剂盒,购自百泰克生物技术有限公司;ABI Taq Man2® PCR MasterMix,为美国 ABI 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 *hsp90* 基因片段的克隆 取拟黑多刺蚁工蚁 5~6 只,按照 Trizol 试剂的使用说明提取总 RNA,用琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测总 RNA 的纯度和浓度。将检测合格的 RNA 用反转试剂盒反转录为第一链 cDNA。根据陕西师范大学动物生殖与发育实验室克隆得到的拟黑多刺蚁 *hsp90* 基因序列(GenBank 序列号为 JN100104.1),用 Primer Premier 5.0 软件设计特异性引物,上游引物(5'→3')为: AGGTCGCCAACAGTTCATTC,下游引物(5'→3')为: CCAGACGACAAAGAG-CAGT,送至南京金斯瑞公司进行合成。以 cDNA 为模板,进行 PCR 扩增,反应体系:模板 1 μ L,上、

下游引物各 1 μ L,2 $\times$ PCR mix 5 μ L,无菌水 2 μ L。反应程序:95 $^{\circ}$ C 3 min;95 $^{\circ}$ C 45 s,65 $^{\circ}$ C 1 min,72 $^{\circ}$ C 1 min,10 个循环;95 $^{\circ}$ C 45 s,55 $^{\circ}$ C 1 min,72 $^{\circ}$ C 1 min,25 个循环;72 $^{\circ}$ C 10 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后,用琼脂糖 DNA 凝胶回收试剂盒回收,将回收片段送往南京金斯瑞公司测序,测序结果在 NCBI 中进行 BLAST 比对。在上下游引物的 5'端加上 T7 启动子(TAATACGACTCAC-TATAGG),再次进行 PCR 扩增及产物电泳、回收、测序(方法同前)。

1.2.2 dsRNA 的合成 参照 T7 RiboMAX™ Express RNAi System 试剂盒说明书合成 dsRNA,将 dsRNA 在室温下不作处理放置不同时间段(0,2,4 和 6 h)后,进行 1%琼脂糖凝胶电泳,检测其在常温下的稳定性,并用 UVP 紫外凝胶成像系统观察目的条带长度是否符合要求。电泳条件:2 μ L dsRNA 原液+2 μ L 6 $\times$ loading buffer 混匀后上样,电压 120 V,时间 15~20 min。取 2 μ L dsRNA 原液,与 48 μ L 0.1% DEPC 处理水混匀,紫外分光光度计检测其浓度及纯度。最后将 dsRNA 于-20 $^{\circ}$ C 保存,备用。

1.2.3 拟黑多刺蚁的 dsRNA 喂食 随机选取同

一批次内发育良好的 30~40 只不同品级的拟黑多刺蚁成虫(工蚁、雄蚁、雌蚁)用于试验。用灭菌的 DEPC 水将合成的 dsRNA 分别稀释成 120,60,30,15 与 7.5 ng/ μ L 的溶液饲喂拟黑多刺蚁成虫。以仅喂食灭菌 DEPC 水的各品级拟黑多刺蚁成虫作为对照。连续喂食 14 d,每天记录不同质量浓度 dsRNA 处理成虫的死亡数目。最后统计整个饲喂过程的累计死亡率。为保证试验的准确性,每个浓度重复 3 次喂养。

1.2.4 RNAi 效应检测 分别设计目的基因 *hsp*、*EcR*、*USP* 实时定量引物和内参基因 β -*actin* 特异性引物,引物序列如表 1 所示。

随机取用 6~8 只 30 ng/ μ L dsRNA 饲喂的拟黑多刺蚁,提取其总 RNA,反转录得到 cDNA,进行荧光实时定量 PCR,检测 *hsp90* 基因 mRNA 的表达变化。荧光实时定量 PCR 在 StepOne™ 荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司)上进行,每个样本重复 3 次,设置不含 cDNA 模板的空白对照。最终结果采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行计算,使用 SPSS 16.0 软件进行统计学分析,并用单因素方差进行差异显著性分析($P<0.05$)。

表 1 拟黑多刺蚁 *hsp90*、*EcR*、*USP* 及 β -*actin* 基因的荧光实时定量 PCR 引物
Table 1 Primers used for expression analysis of *hsp90*, *EcR*, *USP* and β -*actin* in *P. vicina*

基因 Gene	上游引物(5'→3') Forward primers	下游引物(5'→3') Reverse primers
<i>hsp90</i>	ATTATGTTGGCAGGATGA	AACCACGCTTCTTTACTC
<i>USP</i>	AAGTGCTTGGCGATGGG	GCTTTCCACCTCGCTTTGA
<i>EcR</i>	GCTTGCGATGGATGTGCT	CACCTTCAGATTTCGCCTTG
β - <i>actin</i>	CCCTCTTCCAGCCATCGTTC	CCACCGATCCAGACGGAGTA

2 结果与分析

2.1 拟黑多刺蚁 *hsp90* 的克隆及 dsRNA 合成

2.1.1 *hsp90* 的克隆 提取的 RNA 经琼脂糖凝胶电泳检测,出现 28S、18S 和 5S 3 条带(图 1),表明 RNA 的完整性较好;经紫外分光光度计检测,OD₂₆₀/OD₂₈₀ 为 1.8~2.0,表明 RNA 的纯度符合要求,可以用于后续试验。用特异性引物扩增得到 523 bp 的拟黑多刺蚁 *hsp90* 片段(图 2);经纯化试剂盒纯化后,送南京金斯瑞公司测序,经 BLAST 比对发现,扩增片段与目的片段相似性达 95% 以上,说明得到了目的基因片段。在上、下游引物的 5'端加上 T7 启动子后,扩增得到了两端带有 T7 启动子序列的目的基因片段(图 2),表明启动子成功添加,扩增所得产物可以用于 dsRNA 的合成。

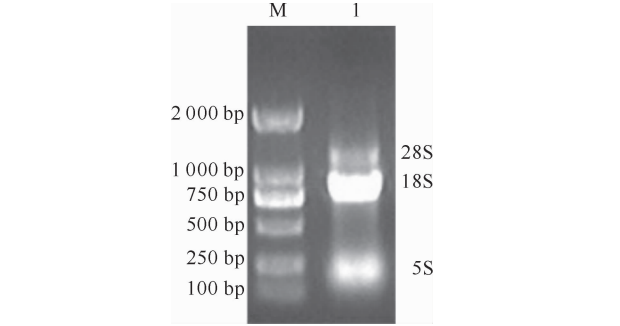


图 1 拟黑多刺蚁总 RNA 的凝胶电泳图
M, DL2000 DNA Marker;1. 总 RNA
Fig. 1 Total RNA of *P. vicina*
M, DL2000 DNA Marker;1. Total RNA

2.1.2 dsRNA 的合成 由图 3 可知,体外合成获得了 523 bp 的 dsRNA,其在常温下放置未发生降解。经紫外分光光度计检测,OD₂₆₀/OD₂₈₀ 为 1.8~2.0,表明 dsRNA 的纯度符合要求,可以用于后续试验。

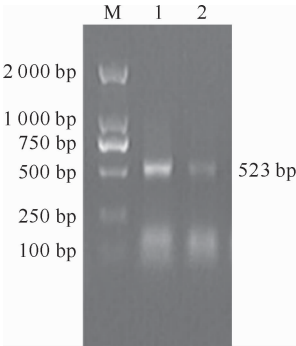


图 2 拟黑多刺蚁 *hsp90* 的 PCR 扩增结果
M. DL2000 DNA Marker;1. 引物 5'端未添加 T7 启动子
扩增片段;2. 引物 5'端添加 T7 启动子后扩增片段
Fig. 2 Amplification of *hsp90* gene segments of
P. vicina through RT-PCR

M. DL2000 DNA Marker;1. Amplified fragments before
without addition of the promoter;2. Amplified fragments
in primer 5' end add T7 promoter

2. 2 饲喂 dsRNA 对拟黑多刺蚁死亡率的影响

饲喂不同质量浓度 dsRNA 后,拟黑多刺蚁的死亡率见图 4。图 4 结果表明,拟黑多刺蚁死亡率随着 dsRNA 质量浓度的增大而升高。120 ng/ μ L dsRNA 喂食 5 d 试虫全部死亡;60 ng/ μ L dsRNA 可导致拟黑多刺蚁成虫大量死亡,而 15 和 7.5 ng/ μ L dsRNA 对拟黑多刺蚁的死亡率影响较小,因此选用 30 ng/ μ L 作为 dsRNA 干扰拟黑多刺蚁

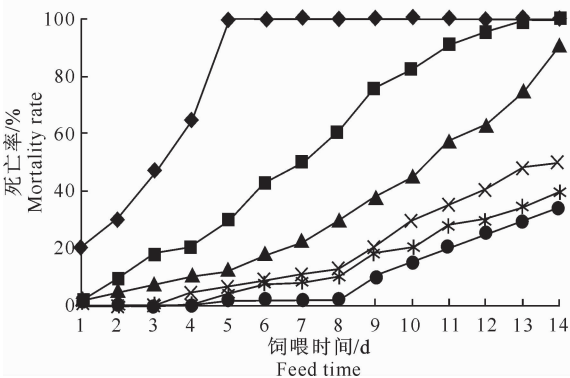


图 4 饲喂 dsRNA 对拟黑多刺蚁死亡率的影响
—◆—, 120 ng/ μ L;—■—, 60 ng/ μ L;—▲—, 30 ng/ μ L;
—×—, 15 ng/ μ L;—*—, 7.5 ng/ μ L;—●—, 对照组
Fig. 4 Effect of feeding dsRNA on *P. vicina* mortality
—◆—, 120 ng/ μ L;—■—, 60 ng/ μ L;—▲—, 30 ng/ μ L;
—×—, 15 ng/ μ L;—*—, 7.5 ng/ μ L;—●—, Control

2. 4 RNA 干扰拟黑多刺蚁成虫 *hsp90* 后对 *EcR*
和 *USP* mRNA 表达的影响

2. 4. 1 对 *EcR* mRNA 表达水平的影响 如图 6

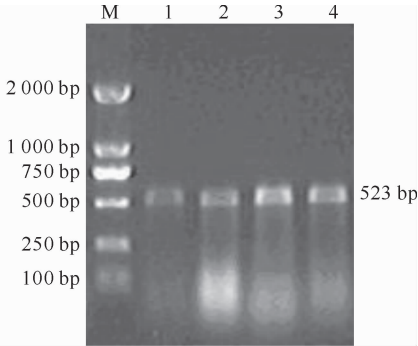


图 3 拟黑多刺蚁 *hsp90* dsRNA 的琼脂糖凝胶电泳
M. DL2000 DNA Marker;1~4. 分别为室温下放置
0,2,4 和 6 h 后的 dsRNA 样品
Fig. 3 Agarose gel electrophoresis of *P. vicina*
hsp90 dsRNA

M. DL2000 DNA Marker;1—4. *hsp90* dsRNA stability tested by
agarose gel electrophoresis at room temperature
after 0,2,4 and 6 h, respectively

hsp90 基因的最佳质量浓度。

2. 3 RNAi 对拟黑多刺蚁 *hsp90* mRNA 表达的
影响

用 dsRNA 喂食之后,拟黑多刺蚁的各个品级成虫的 *hsp90* 基因在 mRNA 水平上的表达均显著降低,且以雌蚁最为明显,其 *hsp90* 基因的表达下降了 76%;雄蚁 *hsp90* 表达下降了 24. 4%;工蚁 *hsp90* 的表达下降了 31. 1%(图 5)。

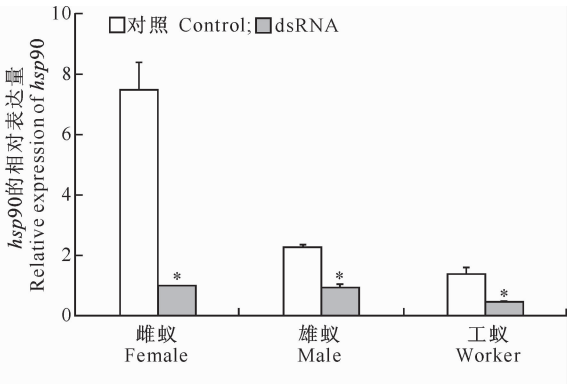


图 5 RNA 干扰对拟黑多刺蚁成虫 *hsp90* 基因
mRNA 表达的影响

* 表示与对照相比差异显著($P<0.05$)。图 7 同

Fig. 5 Effect on the expression of *hsp90* gene mRNA in
P. vicina after RNA interference

* Represents significant difference at $P<0.05$ level.

The same as Fig. 7

所示,*hsp90* 被干扰之后,拟黑多刺蚁所有品级成虫 *EcR* 基因 mRNA 的表达水平均有一定变化,但差异未达到显著水平($P>0.05$)。由此说明,*hsp90* 表达

下调对 *EcR* 的表达没有显著影响。

2.4.2 对 *USP* mRNA 表达水平的影响 如图 7 所示,当 *hsp90* 被干扰之后,拟黑多刺蚁所有品级成虫 *USP* 基因表达均显著下调($P<0.05$),其中以雄

蚁的下调最为明显,其 *USP* 基因表达降低了 84.6%;其次是工蚁,降低了 81%;雌蚁降幅最小,为 50.3%(图 7)。

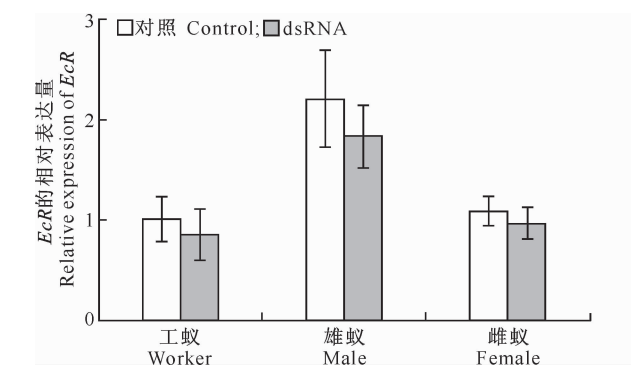


图 6 RNA 干扰拟黑多刺蚁 *hsp90* 基因对 *EcR* 基因 mRNA 表达的影响

Fig. 6 Expression of *EcR* mRNA when *hsp90* of *P. vicina* was interfered by feeding dsRNA

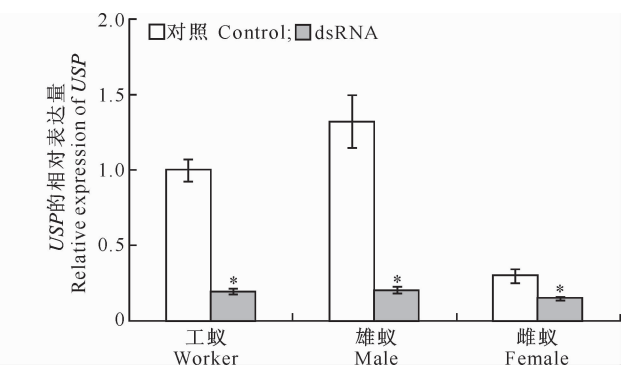


图 7 RNA 干扰拟黑多刺蚁 *hsp90* 基因对 *USP* mRNA 表达水平的影响

Fig. 7 Expression of *USP* mRNA when *hsp90* of *P. vicina* was interfered by feeding dsRNA

3 讨论

HSP90 是一类很重要的伴侣蛋白,它与许多重要信号蛋白的构象成熟有关,但是人们对它们相互之间的识别机制并不清楚^[14]。对绿头蝇的研究显示,在其化蛹前 *hsp90* 的表达会突然增加。蜕皮激素可促进蛹的形成,因此 *hsp90* 表达的增加可能是被蜕皮激素所诱导的^[15]。研究表明,Hsp90 对于果蝇体内蜕皮激素活性的提高是必需的^[7]。在棉铃虫的表皮细胞系中发现,用 dsRNA 干扰 *hsp70* 基因的结果与敲除 *EcR* 和 *USP* 后的结果类似,而干扰 *hsp90* 后,会导致 *USP1*、*E75BP* 以及 *HR3* 表达下调,而这些基因均为 20E 相关基因,证明 *hsp90* 参与了 20E 信号通路;同时还发现,敲除 *hsp90* 基因后,可以导致 JH 通路上的 *kr-h1* 表达下调,表明 *hsp90* 也参与了 JH 信号通路,因此 *hsp90* 可能是 20E 和 JH 通路形成“交叉互作”的一个重要基因^[9]。

RNAi 是一种转录后基因沉默技术。目前, RNAi 已在基因功能决定、基因敲除、癌症治疗以及抗病毒药物开发等多个领域广泛应用^[10]。近些年来,研究人员已利用 RNAi 阐明了多种昆虫相关基因的功能作用,而昆虫 RNAi 的方法主要有注射法、饲喂法和组织培养法^[11]。本试验采用饲喂法进行 RNAi,结果发现,30 ng/ μ L dsRNA 是对拟黑多刺蚁 *hsp90* 进行干扰的最适质量浓度。在此质量浓度下,雌蚁 *hsp90* 基因的表达被抑制效果较好,说明干

扰 *hsp90* 对雌蚁的影响更大。成功干扰 *hsp90* 基因后, *EcR* 的表达没有显著性变化,但是 *USP* 的表达显著下调,且工蚁和雄蚁 *USP* 的表达下调较为明显。说明 *USP* 基因在成虫阶段可能与 *hsp90* 基因关系密切,其对工蚁及雄蚁生理功能有重要影响,对雌蚁影响不大。 *hsp90* 对于 *EcR* 和 *USP* 的作用与在棉铃虫和果蝇上的研究结果^[6]类似,但是 *hsp90* 对 *USP* 表达的具体影响机制尚不清楚,有待进一步的研究。

本试验通过饲喂 dsRNA,成功干扰了拟黑多刺蚁 *hsp90* 基因的表达,同时证实 *hsp90* 与 *USP* 基因表达有一定关联,这为研究拟黑多刺蚁其他基因的功能提供了参考,同时也为将 dsRNA 应用于害虫防治,进而开发新型农药提供了依据。

【参考文献】

[1] Ritossa F A. New puffing pattern in duced by temperature shock and DNP in *Drosophila* [J]. Experientia,1962,18(12):571-573.

[2] Lindquist S,Craig E A. The heat-shock proteins [J]. Annu Rev Genet,1988,22:631-677.

[3] Huang L H,Wang C Z,Kang L. Cloning and expression of five heat shock protein genes in relation to cold hardening and development in the leafminer, *Liriomyza sativa* [J]. Journal of Insect Physiology,2009,55:279-285.

[4] Jatuporn T,Nujira T,Tippawan S,et al. Characteristic expression of three heat shock-responsive genes during larval diapause in the bamboo borer *Omphisca fuscidentalis* [J]. Zoological Science,2008,25:321-333.

[5] Xu C S,Xiong L,Lu L D. Advance in research on effects of

- heat shock protein during embryo development [J]. Developmental & Reproductive Biology, 2000, 9(1): 73-82.
- [6] Eileen K, Andreas V. Post-embryonic functions of *hsp90* in *Tribolium castaneum* include the regulation of compound eye development [J]. Dev Genes Evol, 2013, 221: 357-362.
- [7] Arbeitman M N, Hogness D S. Molecular chaperones activate the *Drosophila ecdysone* receptor, an RXR heterodimer [J]. Cell, 2000, 101(1): 67-77.
- [8] Yue L, Karr T L, Nathan D F, et al. Genetic analysis of viable *hsp90* alleles reveals a critical role in *Drosophila spermatogenesis* [J]. Genetics, 1999, 151: 1065-1079.
- [9] Wen L, Zhang F X, Cai M J, et al. The hormone-dependent function of *hsp90* in the crosstalk between 20-hydroxyecdysone and juvenile hormone signaling pathways in insects is determined by differential phosphorylation and protein interactions [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2013, 1830 (11): 5184-5192.
- [10] 宋尔卫. RNA 干扰的生物学原理与应用 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2005: 701-711
- Son E W. Biological principles of RNA interference and applications [M]. Beijing: Higher Education Press, 2005: 701-711. (in Chinese)
- [11] 何正波, 陈 斌, 冯国忠. 昆虫 RNAi 技术及应用 [J]. 昆虫知识, 2009, 46(4): 525-532.
- He Z B, Chen B, Feng G Z. Insect RNAi technology and application [J]. Chinese Bulletin of Entomology, 2009, 46(4): 525-532. (in Chinese)
- [12] Hanneke H, Guy S. Mechanisms of dsRNA uptake in insects and potential of RNAi for pest control: A review [J]. Journal of Insect Physiology, 2009, 56(3): 227-235.
- [13] Turner C T, Davy M W, MacDiarmid R M. RNA interference in the light brown apple moth, *Epiphyas postvittana* (Walker) induced by double-stranded RNA feeding [J]. Insect Molecular Biology, 2006, 15(3): 383-391.
- [14] Pelham H R B. Speculations on the functions of the major heat shock and glucose-regulated proteins [J]. Cell, 1986, 46(5): 959-961.
- [15] Tachibana S I, Numata H, Goto S G. Gene expression of heat-shock proteins (Hsp23, Hsp70 and Hsp90) during and after larval diapause in the blow fly *Lucilia sericata* [J]. Journal of Insect Physiology, 2005, 51: 641-647.

(上接第 190 页)

- [11] 曹 凯, 余 新, 赵艳艳, 等. 沙地番茄无土栽培基质的筛选 [J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2013, 41(6): 147-152.
- Cao K, She X, Zhao Y Y, et al. Selection of soilless substrate for sand land tomato [J]. Journal of Northwest A&F University: Nat Sci Ed, 2013, 41(6): 147-152. (in Chinese)
- [12] 冯海萍, 曲继松, 张丽娟, 等. 柠条发酵粉复配鸡粪基质对黄瓜光合指标和产量的影响 [J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2013, 41(4): 119-124.
- Feng H P, Qu J S, Zhang L J, et al. Effects of caragana-straw ferment powder mixed with chicken dung on photosynthetic indexes and yields of cucumber [J]. Journal of Northwest A&F University: Nat Sci Ed, 2013, 41(4): 119-124. (in Chinese)
- [13] 徐文俊, 程智慧, 孟焕文, 等. 农业废弃有机物基质配方对番茄生长及产量的影响 [J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2012, 40(4): 127-133.
- Xu W J, Cheng Z H, Meng H W, et al. Influence of the formula of organic waste substrate from crop production on growth and yield of tomato [J]. Journal of Northwest A&F University: Nat Sci Ed, 2012, 40(4): 127-133. (in Chinese)
- [14] 蒋卫杰, 杨其常. 小康之路·无土栽培特选项目与技术 [M]. 北京: 科学普及出版社, 2008: 46-52.
- Jiang W J, Yang Q C. Well-off road · chosen with technology project soilless cultivation [M]. Beijing: Science Popularization Publishing House, 2008: 46-52. (in Chinese)
- [15] 田 洪, 王殿芝, 赵占英, 等. 东北对开蕨的栽培 [J]. 人参研究, 1997(2): 16-17.
- Tian H, Wang D Z, Zhao Z Y, et al. Cultivation of *Phyllitis japonica* [J]. Study on Ginseng, 1997(2): 16-17. (in Chinese)
- [16] Nielsen D C, Nelson N O. Black bean sensitivity to water stress at various growth stages [J]. Crop Sci, 1998, 38: 422-427.
- [17] Zhang J, Arelli P R, Sleper D A, et al. Genetic diversity of soybean germplasm resistant to *Heterodera glycines* [J]. Euphytica, 1999, 107: 205-216.
- [18] 李贵全, 张海燕, 季 兰, 等. 不同大豆品种抗旱性综合评价 [J]. 应用生态学报, 2006, 17(12): 2408-2412.
- Li G Q, Zhang H Y, Ji L, et al. Comprehensive evaluation on drought-resistance of different soybean varieties [J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2006, 17(12): 2408-2412. (in Chinese)
- [19] 余家林. 农业多元试验统计 [M]. 北京: 北京农业大学出版社, 1993: 141-192.
- Yu J L. Multiple experimental statistics in agriculture [M]. Beijing: Beijing Agricultural University Press, 1993: 141-192. (in Chinese)