

## 棉铃虫 *HaHR3* 基因的克隆及其植物 RNA 干扰载体的构建

尹富仕, 曾洪梅\*, 张雨良, 邱德文, 杨秀芬, 王立梅

(中国农业科学院植物保护研究所 / 农业部生物防治重点开放实验室, 北京 100081)

**摘要:** 采用 RT-PCR 方法克隆了棉铃虫蜕皮调节转录因子 *HaHR3* 基因, 该基因含有 1671 bp 的完整开放阅读框。序列分析表明, *HaHR3* 与多种昆虫蜕皮调节转录因子高度同源。利用生物信息学方法对 *HaHR3* 的结构特征进行分析发现, *HaHR3* 具有蜕皮调节转录因子超家族的典型特征, 包括两个锌指结构和一个 DNA 结合结构域, 不存在信号肽序列和 N 糖基化位点。选择 *HaHR3* 基因的部分片段构建了 RNAi 中间载体 pRNAi1017-*HaHR3sa*, 再将 *HaHR3* 正反向序列亚克隆至植物表达载体 pCAMBIA2300-35S-OCS, 成功构建了由 35s 启动子调控的 *HaHR3* 基因的正反向 RNA 干扰载体 pCAM-RNAi-*HaHR3*。这一载体的成功构建为下一步通过植物介导的 RNA 干扰技术防治棉铃虫打下了坚实的基础。

**关键词:** 棉铃虫; 蜕皮调节转录因子; 结构分析; RNA 干扰

**中图分类号:** S562.035.3 **文献标识码:** A

**文章编号:** 1002-7807(2010)02-0157-06

## Cloning of *Helicoverpa armigera* Gene *HaHR3* and Construction of Its RNA Interference Vector

YIN Fu-shi, ZENG Hong-mei\*, ZHANG Yu-liang, QIU De-wen, YANG Xiu-fen, WANG Li-mei

(Key Laboratory for Biological Control of Ministry of Agriculture, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

**Abstract:** The molt-regulating transcription factor (hormone receptor 3, *HR3*) controls the expression of related gene clusters in the process of molting and plays a key role in the regulation of molt cascade reactions. The cDNA segments of *HaHR3*, *HR3* from *Helicoverpa armigera*, were cloned using RT-PCR. With an open reading frame of 1671 bp, *HaHR3* showed 98% identity with *HR3* (AF337637) in homology comparison. The structure analysis indicated that *HaHR3* has the typical characters of the superfamily of molt-regulating transcription factors, including two zinc finger motifs and a DNA binding domain. Neither signal peptide sequence nor N-glycosylated site was found in the *HaHR3*. Based on the sequence of *HaHR3*, the RNAi vector pRNAi1017-*HaHR3sa* was constructed. By subcloning the sense-antisense sequence of *HaHR3* into the plant expression vector pCAMBIA2300-35S-OCS, pCAM-RNAi-*HaHR3*, the RNAi vector of the *HaHR3* gene which is driven by the 35 S promoter, was constructed. This provides a solid foundation for the application of the plant-mediated RNAi technique in the biological control of *Helicoverpa armigera*.

**Key words:** *Helicoverpa armigera*; *HaHR3* gene; structure analysis; RNA interference

蜕皮调节转录因子是广泛存在于多种昆虫中、调控幼虫蜕皮过程中相关基因表达的重要功能蛋白, 在昆虫蜕皮调控中起着十分重要的作用<sup>[1-2]</sup>。蜕皮调节转录因子蛋白属于核受体超家族成员。现已克隆和鉴定的该类蛋白主要有果蝇的 *DmHR3*、埃及斑蚊的 *AaHR3*、家蚕的 *BmHR3*、烟草天蛾的 *MHR3*、大蜡螟的 *GmHR3* 和杉色卷蛾

的 *CfHR3* 等。果蝇蜕皮调节转录因子蛋白 *DmHR3* 目前研究得较为透彻, 已经证明在果蝇的蜕皮级联反应和变态发育过程中起着十分重要的作用<sup>[3-4]</sup>。在家蚕的胚胎发育中, *BmHR3* 可能在家蚕卵巢的生成过程中起着重要的调控作用<sup>[5]</sup>。此外, 烟草天蛾、大蜡螟等昆虫的蜕皮调节转录因子蛋白也具有类似的功能。在昆虫的生长发育

收稿日期: 2009-06-29 作者简介: 尹富仕(1985-), 男, 在读硕士; \* 通讯作者, zenghongmei666@yahoo.com.cn

基金项目: 国家“973”计划项目(2003CB114204); 国家“863”计划项目(2006AA10A210); 转基因专项(2008ZX08010-004)

过程中,若蜕皮调节转录因子表达被抑制,则昆虫不能完成正常蜕皮过程<sup>[6]</sup>,最终导致幼虫死亡。

RNA 干扰(RNA interference, RNAi)是近年来发现的一种新的基因调控机制<sup>[7]</sup>。它利用 RNA 序列匹配,专一地识别靶基因,在转录水平、转录后水平或翻译水平抑制靶基因表达,已被广泛用于基因功能研究、疾病治疗和农业应用,显示了广阔的利用前景<sup>[8,9]</sup>。在植物中, RNA 干扰参与抗胁迫逆境和抗病等反应。植物介导的昆虫重要靶标蛋白基因 RNA 干扰技术的发展表明,植物内源小 RNA 可能与植物生长发育调控和抗虫性有关<sup>[10]</sup>。这为植物与昆虫相互关系的研究、农业害虫的防治等提供了重要的科学依据。

棉铃虫 [*Helicoverpa armigera* (Hübner)] 是重要的农业害虫,危害棉花、玉米、小麦等多种农作物。尽管种植抗 Bt 棉品种使棉铃虫得到了有效控制<sup>[11]</sup>,但由于害虫抗性的不断发展,使潜在的害虫暴发风险越来越大,亟待发展新的防治方法<sup>[10]</sup>。通过 RNA 干扰棉铃虫蜕皮调节转录因子的表达来抑制其正常生长发育有可能成为极具潜力的控制技术之一。本文在克隆棉铃虫蜕皮调节转录因子 *HaHR3* 的基础上,分析了 *HaHR3* 蛋白的结构特征,构建了 *HaHR3* 的植物 RNA 干扰载体,旨在通过应用 RNA 介导的基因沉默技术抑制蜕皮调节转录因子的表达,阻碍棉铃虫幼虫的正常发育,生态调控害虫种群数量,为棉铃虫的生物防治提供一条新的途径。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料与试剂

棉铃虫幼虫由中国农业科学院植保所棉虫组赠送。

质粒及菌株:pMD19-T、pMD18-T simple、植物表达载体 pCAMBIA2300、RNAi 干扰中间载体 pRNAi1017 及大肠杆菌 DH5 $\alpha$  等菌株均由本实验室保存。

酶及主要试剂:Trizol Reagent 购自 Invitrogen 公司,M-MLV RT RnaseH、Rnase Inhibitor、及 Ex-Taq 酶均购自 TaKaRa 公司,限制性内切酶 Xho I、BglII、BamH I、Sal I、Pst I 和 T<sub>4</sub> 连接酶购自 NEB 公司,琼脂糖凝胶回收 Kit 和质粒小提

Kit 购自北京天根生物技术公司。

### 1.2 棉铃虫总 RNA 的提取与 cDNA 的合成

按 Invitrogen 公司 Kit 说明用 Trizol 法从棉铃虫 5 龄幼虫中提取总 RNA。

cDNA 的合成按大连宝生物工程有限公司 cDNA Kit 说明书进行。

### 1.3 棉铃虫蜕皮调节转录因子 *HaHR3* 的克隆

参考赵小凡<sup>[12]</sup>等在 GenBank 中登陆的棉铃虫蜕皮调节转录因子基因序列(AF337637),用 Primer Premier 5.0 设计了一对特异引物,用于目的基因的 PCR 扩增。引物在 Invitrogen-上海英俊生物技术有限公司合成。其中,正义链引物:5'-ATGAACAACAACCAGTTCCACG-3',反义链引物:5'-TTAACCGTGGGTGTAGTCCAGG-3'。

通过 RT-PCR 方法获得棉铃虫蜕皮调节转录因子 *HaHR3*, 将获得的 *HaHR3* 全长基因与 pMD19-T 克隆载体连接后,转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 。经菌液 PCR、双酶切鉴定正确后,挑取 6 个阳性单克隆,送至上海英俊公司测序。

### 1.4 *HaHR3* 基因的生物信息学分析

利用生物信息学数据库和因特网上的软件对 *HaHR3* 基因及其蛋白加以分析。用 ProtParam 分析 *HaHR3* 蛋白的氨基酸序列组成、相对分子质量和等电点等理化性质(<http://au.expasy.org/tool/protpara.html>);利用 SOPMA 预测 *HaHR3* 蛋白的二级结构组成([http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=/NPSA/npsa\\_sopma.html](http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_sopma.html));利用 Scanprosite 搜索 *HaHR3* 蛋白的 Motif(<http://us.expasy.org/prosite/>);用 ProtFun 分析预测 *HaHR3* 蛋白的功能(<http://www.cbs.dtu.dk/services/ProtFun/>)。

### 1.5 *HaHR3* 干扰中间载体(pRNAi1017-*HaHR3sa*)的构建

为了便于构建双向 RNA 干扰载体,设计引物克隆 *HaHR3* 的一段特异 DNA(460 bp)作为干扰片段。正向序列引入 Xho I 和 Bgl II 酶切位点,其上游引物 *HaHR3*-RNAi460-P1:5'-ccCTCGAGATGAACAACAACCAGTTCCACGAT-3';下游引物 *HaHR3*-RNAi460-P2:5'-gaAGATCTCACGCAGGCTTTATTCCGTGGACA-3'。反向序列引入 Sal I 和 BamH I 的酶切位点,其上

游引物 HaHR3-RNAi460-P3: 5'-gcGTCGAC AT GAACAACAACCAGTTCCACGAT-3'; 下游引物 HaHR3-RNAi460-P4: 5'-cgGGATCCCACGCAGG CTTTATTCCGTGGACA-3'。

用分别带有 *Xho* I 和 *Bgl* II 酶切位点的引物 HaHR3-RNAi460-P1 和 HaHR3-RNAi460-P2, 以上所述的 pMD19-T/*HaHR3* 重组质粒为模板, 进行 PCR 扩增, 获得两端带有 *Xho* I 和 *Bgl* II 位点的 *HaHR3* 干扰片段。把这一 PCR 产物亚克隆到 pMD18-Tsimple 上, 用 *Xho* I 和 *Bgl* II 双酶切, 切下的片段连接到经同样双酶切的 pRNAi1017 干扰载体上, 构建成重组质粒 pRNAi1017-*HaHR3s*。用 *Xho* I 和 *Bgl* II 双酶切鉴定 *HaHR3* 基因干扰片段是否正向连到 pRNAi1017 载体上。

用分别带有 *Sal* I 和 *Bam* H I 酶切位点的引物 HaHR3-RNAi460-P3 和 HaHR3-RNAi460-P4, 以 pMD19-T/*HaHR3* 重组质粒为模板, 进行 PCR 扩增, 获得两端带有 *Sal* I 和 *Bam* H I 位点的 *HaHR3* 干扰片段。把这一 PCR 产物亚克隆到 pMD18-Tsimple 上, 用 *Sal* I 和 *Bam* H I 进行双酶切, 切下的片段 T<sub>4</sub> 连接酶连接到经同样双酶切的重组质粒 pRNAi1017-*HaHR3s* 上, 构建成含有 *HaHR3* 正反向序列的 RNA 干扰载体 pRNAi1017-*HaHR3sa*。用 *Sal* I 和 *Bam* H I 双酶切鉴定 *HaHR3* 基因是否反向插入到 pRNAi1017-*HaHR3s* 重组质粒中。

### 1.6 植物转基因干扰载体(pCAM-RNAi-*HaHR3*)的构建

将植物表达载体 pCAMBIA2300-35S-OCS 与 *HaHR3* 干扰中间载体(pRNAi1017-*HaHR3sa*) 分别用 *Sal* I 和 *Pst* I 进行双酶切, 再利用 T<sub>4</sub> 连接酶连接 pCAMBIA2300-35S-OCS 空载体和带有内含子的目的基因正反向序列, 转化并筛选阳性克隆子, 经 PCR 验证和酶切鉴定后, 将重组质粒送 invitrogen- 上海英俊生物技术公司测序。

## 2 结果与分析

### 2.1 棉铃虫蜕皮调节转录因子 *HaHR3* 基因的克隆

取棉铃虫 5 龄幼虫 3 头, 提取其总的 RNA, 经琼脂糖凝胶电泳分离, 28S 核糖体 RNA 与 18S

核糖体 RNA 的带型清晰, 无基因组 DNA 的污染 (图略)。为进一步确定 RNA 质量, 使用紫外分光光度计在波长 230 nm、260 nm 和 280 nm 下测吸光度, 得出  $A_{260}/A_{230} = 2.104$ , 大于 2.00;  $A_{260}/A_{280} = 1.937$ , 说明此 RNA 完整性较好, 纯度较高, 不存在蛋白质、多醌和酚类物质的明显污染, 符合实验要求。

用正义链和反义链引物进行 RT-PCR, 扩增产物经 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳, 显示得到了一个约为 1600 bp 的 DNA 片段 (图 1)。RT-PCR 产物纯化后克隆到 pMD19-T 载体上, 挑取阳性克隆进行 PCR 鉴定, 得到了同预期大小相当的片段 (图略)。



M: 标准分子量; 1: RT-PCR 扩增产物。

图 1 棉铃虫蜕皮调节转录因子 *HaHR3* 的 RT-PCR 扩增

Fig.1 The RT-PCR amplification of *Helicoverpa armigera HaHR3* gene

挑取 PCR 鉴定和酶切验证正确的阳性克隆 6 个进行测序分析, 所得结果一致。由此获得了棉铃虫蜕皮调节转录因子基因的全序列。其 ORF 为 1671 bp, 编码 556 个氨基酸残基, 将该基因命名为 *HaHR3*。目前, 该基因已经在 GenBank 中登录, 登录号为 FJ009448。

### 2.2 *HaHR3* 同源基因的搜索和比对

利用 NCBI 网站数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 对 *HaHR3* 的同源性基因进行比对和搜索, 结果显示, *HaHR3* 与已报道的棉铃虫 *HHR3* (AF33763) 基因同源性最高 (98%), 与大蜡螟 (P49868)、烟草天蛾 (Q08882)、杉色卷蛾 (AAC47163)、家蚕 (NP\_001037012) 中的蜕皮调节转录因子也高度同源。利用生物软件 DNAMAN 分析得知, *HaHR3* 与上述蛋白的氨基酸序列一致性分别

为 98%、93.3%、87.3%、79.9% 和 71.2%。其中 DNA 结合区域氨基酸同源性最高,其次是配体结合区域和纽链结合区域。

根据它们的序列一致性高低构建系统发育树,如图 2:

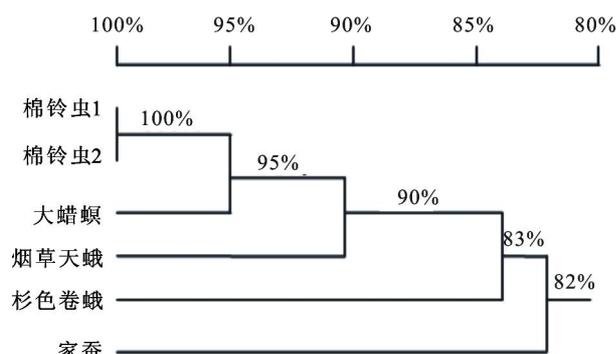


图 2 几种昆虫蜕皮转录调节因子系统发育树的构建  
Fig.2 Phylogenetic tree of molt-regulating transcription factors from several insects

### 2.3 HaHR3 蛋白质结构与功能预测

所得的棉铃虫蜕皮调节转录因子 *HaHR3* 编码 556 个氨基酸,理论分子量为 62.1 kDa,等电点为 6.62,*HaHR3* 蛋白在 72~90 氨基酸处存在一个由外向内的过膜螺旋,103~133 氨基酸处为核激素接受子的 DNA 结合域。PSORT II Prediction 软件分析预测表明,*HaHR3* 为细胞核蛋白(19.325%)。Scanprosite 软件分析表明,*HaHR3* 基因编码的蛋白含有 2 个锌指结构(zf-C4)和 1 个 DNA 结合结构域,这是蜕皮调节转录因子超家族的典型特征。SOPMA 二级结构预测表明,*HaHR3* 基因编码的蛋白含  $\alpha$ -螺旋(39.03%), $\beta$ 转角(5.58%),延伸链(11.69%)和无规则卷曲(43.71%)。ProtFun 预测表明,*HaHR3* 蛋白的主要功能有结合特定序列的 DNA、调控蜕皮级联反应、转录调控、调节新陈代谢作用及调节生物合成等。*HaHR3* 蛋白不存在信号肽序列和 N 糖基化位点。另外,已有的研究表明,HR3 家族大都可以与

同一个激素反应元素 RORE 结合。RORE 具有的典型特征含有一个 5'-AGGTCA-3' 位点,并且紧接它上游是一个 6 碱 AT 富集区<sup>[12]</sup>。

### 2.4 *HaHR3* 干扰中间载体 pRNAi1017-*HaHR3* sa 的构建

按照 1.5 的方法,以 pMD19-T/*HaHR3* 重组质粒为模板,用特异引物 *HaHR3*-RNAi-P1 和 *HaHR3*-RNAi-P2 进行 PCR 扩增,获得了两端带有 *Xho*I 和 *Bgl*II 位点的 *HaHR3* 干扰片段(图 3)。把这一 PCR 产物亚克隆到 pMD18-Tsimple 上,用 *Xho*I 和 *Bgl*II 进行双酶切,切下的片段连接到经同样双酶切的 pRNAi1017 干扰载体上,构建成重组质粒 pRNAi1017-*HaHR3*s。对此重组质粒进行 *Xho*I 和 *Bgl*II 双酶切,切出了一条约为 460 bp 的条带,表明 *HaHR3* 基因干扰片段正向连接到 pRNAi1017 载体上。



M: 标准分子量; 1: 正向序列 PCR 产物; 2: 反向序列 PCR 产物。

图 3 *HaHR3* 基因 RNA 干扰片段正向序列与反向序列 PCR 扩增

Fig.3 The PCR amplification of sense and antisense sequence of *HaHR3* gene RNA interference fragment

同样,经 *Sal*I 和 *Bam*H I 酶切,将 *HaHR3* 基因干扰片段反向连到 pRNAi1017-*HaHR3*s 重组质粒中,构建成 *HaHR3* 干扰中间载体 pRNAi1017-*HaHR3*sa(图 4)。



图 4 *HaHR3* 基因正反干扰载体构建示意图

Fig.4 Interfere vector map of sense and antisense fragment of *HaHR3* gene

## 2.5 植物转基因干扰载体 pCAM-RNAi-HaHR3 的构建

将 pRNAi1017-HaHR3sa 中的 *HaHR3* 正反向序列用 *Sal*I 和 *Xho*I 双酶切, 亚克隆至经同样双酶切的植物表达载体 pCAMBIA2300-35S-OCS 中, 构建成由 35S 启动子调控的 *HaHR3* 基因的正反向 RNA 干扰载体 pCAM-RNAi-HaHR3 (图 5)。将构建成的植物转基因干扰载体 pCAM-RNAi-HaHR3 用 *Sal*I 和 *Pst*I 进行双酶切, 切出了 1300 bp 的条带(图略), 表明 *HaHR3* 基因干扰片段的正反向序列已成功地插入到植物表达载体 2300-35S-OCS 中, 可以用于后续的转基因操作。图 5 为构建好的植物转基因干扰载体 pCAM-RNAi-HaHR3。

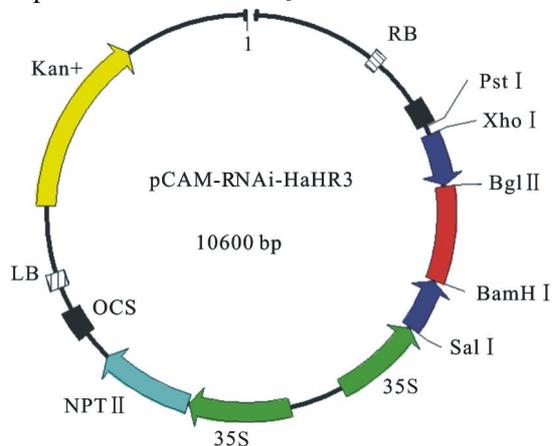


图 5 植物 RNA 干扰载体 pCAM-RNAi-HaHR3  
Fig.5 Plant RNAi vector pCAM-RNAi-HaHR3

## 3 讨论

本研究根据已知棉铃虫基因 *HHR3* 设计并合成了一对特异性引物, 以棉铃虫幼虫总 RNA 为模板, 采用 RT-PCR 方法, 得到了长度为 1671 bp、与 *HHR3* 高度同源的棉铃虫蜕皮调节转录因子基因的 cDNA 片段, 将其命名为 *HaHR3*。本实验克隆基因所用的酶是 TaKaRa 公司的 Ex-Taq 酶, 具有较高的保真性。同时, 挑取了 6 个阳性单克隆到上海英俊公司测序, 均得到一致的结果, 测序结果应该很准确。分析 *HaHR3* 与 *HHR3* 序列差异的原因, 可能是由于蜕皮调节转录因子基因家族具有多态性, 不同地区的棉铃虫个体存在差异, 因此, 该家族基因序列也可能存在一定的差异。对棉铃虫、大蜡螟、杉色卷蛾、家蚕、烟草天

蛾等昆虫蜕皮调节转录因子氨基酸的进化关系进行分析发现, 棉铃虫幼虫 *HaHR3* 基因的 cDNA 片段与已报道的昆虫 *HR3* 基因具有较高的同源性, 预示该基因可能与已报道的基因具有相同的功能。对 *HaHR3* 氨基酸序列进行生物信息学分析, 研究其结构和功能, 显示其具有蜕皮调节转录因子超家族的典型特征。本研究首次成功构建的 *HaHR3* 干扰片段的植物表达载体, 为下一步通过转基因植物验证 *HaHR3* 基因功能和利用植物介导的 RNAi 干扰技术防治棉铃虫奠定了技术基础。

昆虫在整个发育周期中, 要经过多次蜕皮才能化蛹和成熟, 这种生长与蜕皮交替的生理过程是由保幼激素和蜕皮激素调控的<sup>[13-14]</sup>。昆虫蜕皮过程是由一个调控元调控的一系列基因组成的级联反应<sup>[15]</sup>, 蜕皮调节转录因子是蜕皮激素直接诱导的早期基因家族的典型表达产物, 它被激活表达后又与其靶 DNA 上的特定序列结合, 参与蜕皮激素引发的晚期基因转录产物的调控, 是蜕皮级联反应中的关键因子<sup>[16]</sup>。若蜕皮调节转录因子表达被抑制, 则昆虫不能完成正常蜕皮过程<sup>[6]</sup>。相反, 若蜕皮调节转录因子表达量显著提高时, 昆虫会出现提前的不完全蜕皮而导致死亡, 同样不能完成蜕皮过程<sup>[17]</sup>。因此, 当蜕皮调节转录因子功能缺陷或过量诱导表达时, 均会扰乱昆虫正常的蜕皮级联反应, 导致昆虫不正常的蜕皮或畸形发育而死亡。利用植物介导的 RNA 干扰技术来沉默 *HaHR3* 基因, 有可能使棉铃虫不能正常生长发育, 有效降低种群数量, 成为棉铃虫持续控制的有效途径之一。另外, 本研究获得的棉铃虫蜕皮调节转录因子基因的 cDNA 片段, 也可用于尝试通过细菌介导的 RNA 干扰技术在细菌或者植物内生菌中进行 dsRNA 合成, 通过喷施植物, 使害虫在取食植物的同时, 自身生长发育受到抑制<sup>[18]</sup>。目前, 本实验室已将构建的 *HaHR3* 植物 RNA 干扰载体用于转基因棉花的研究, 相关工作正在进行中。

### 参考文献:

[1] ZHAO Xiao-fan, Wang Jin-xing, Xu Xia-lian, et al. Molecular

- cloning and expression of molt-regulating transcription factor from *Helicoverpa armigera*[J]. *Insect Molecular Biology*, 2004, 8:407.
- [2] 赵小凡. 棉铃虫蜕皮调节转录因子在大肠杆菌中的重组表达及其包涵体纯化[J]. *昆虫学报*, 2004, 47(3): 281-286.
- ZHAO Xiao-fan. Recombinant expression and purification of inclusion bodies of the molt-regulating transcription factor *HHR3* from *Helicoverpa armigera*[J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2004, 47(3): 281-286.
- [3] KAGEYAMA Y, Masuda S, Hirose S, et al. Temporal regulation of the mid-prepupal gene FTZ-F1: DHR3 early late gene product is one of the plural positive regulators[J]. *Genes Cells*, 1997, 2: 559-569.
- [4] LAM G T, Jiang Chan-gan, Thummel C S. Coordination of larval and prepupal gene expression by the DHR3 orphan receptor during *Drosophila* metamorphosis[J]. *Development*, 1997, 124(9): 57-69.
- [5] THEOPHANY E, Luc S, Kostas I. The orphan nuclear receptor BmHR3A of *Bombyx mori*: hormonal control, ovarian expression and functional properties[J]. *Mechanisms of Development*, 2001, 103: 107-115.
- [6] YAO Tso-pang, Segreaves W A, Oro A E, et al. *Drosophila* ultraspiracle modulates ecdysone receptor function via heterodimer formation[J]. *Cell*, 1992, 71: 63-72.
- [7] MATZKE M, Matzke A J, Kooter J M. RNAi guiding gene silencing[J]. *Science*, 2001, 293: 1080-1083.
- [8] WATERHOUSE P M, Helliwell C A. Exploring plant genomes by RNA induced gene silencing[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2003, 4: 29-38.
- [9] MATTEW L. RNAi for plant functional genomics [J]. *Comparative and Functional Genomics*, 2004, 5: 240-244.
- [10] MAO Ying-bo, Cai Wen-juan, Chen Xiao-ya, et al. Silencing a cotton bollworm P450 monooxygenase gene by plant-mediated RNAi impairs larval tolerance of gossypol[J]. *Nature Biotechnol*, 2007, 25(11): 1307-1313.
- [11] 秦永华, 乔志新, 刘进元. 转基因技术在棉花育种上的应用[J]. *棉花学报*, 2007, 19(6): 482-488.
- QIN Yong-hua, Qiao Zhi-xin, Liu Jin-yuan. Application of genetic transformation in cotton breeding[J]. *Cotton Science*, 2007, 19(6): 482-488.
- [12] PALLI S R, Ladd T R, Sohi S S, et al. Cloning and developmental expression of Choristoneura hormone receptor 3, an ecdysone-inducible gene and a member of the steroid hormone receptor superfamily[J]. *Insect Biochem Mol Biol*, 1996, 26: 485-499.
- [13] HUANG Ji-kun, Rozelle S, Pray C, et al. Plant biotechnology in China[J]. *Science*, 2002, 295: 674-677.
- [14] RIDDIFORD L M. Hormone receptors and the regulation of insect metamorphosis[J]. *Receptor*, 1993, 3: 203-209.
- [15] KAPITSKAYA M Z, Li Chao, Miura K, et al. Expression of the early-late gene encoding the nuclear receptor HR3 suggests its involvement in regulating the vitellogenic response to ecdysone in the adult mosquito[J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2000, 160: 25-37.
- [16] HUET F, Ruiz C, Richards G. Sequential gene activation by ecdysone in *Drosophila melanogaster*: The hierarchical equivalence of early and early late genes[J]. *Development*, 1995, 121: 1195-1204.
- [17] RETNAKARAN A, Hiruma K, Palli S R, et al. Molecular analysis of the mode of action of RAH5992, a lepidopteran-specific, non-steroidal ecdysteroid agonist[J]. *Insect Biochem Mol Biol*, 1995, 25: 109-118.
- [18] 张雨良, 曾洪梅, 杨秀芬, 等. 玉米螟 P450 基因 cDNA 的克隆及植物次生物质对其诱导表达[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2009, 25(2): 126-131.
- ZHANG Yu-liang, Zeng Hong-mei, Yang Xiu-fen, et al. Cloning of *Ostrinia furnacalis* P450 gene cDNA and inducible expression of secondary plant metabolite [J]. *Chinese J Biochem Mol Biol*, 2009, 25(2): 126-131. ●