

RNAi 技术在中国昆虫学研究中的 发展、应用与展望*

田宏刚^{1**} 刘同先¹ 张文庆^{2***}

(1. 西北农林科技大学旱区作物逆境生物学国家重点实验室, 农业部西北黄土高原作物有害生物综合治理重点实验室, 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 RNAi 现象从其原理揭示至今已有 20 余年的历史, 我国昆虫学家利用 RNAi 技术在褐飞虱 *Nilaparvata lugens*、飞蝗 *Locusta migratoria*、豌豆蚜 *Acyrtosiphon pisum*、烟粉虱 *Bemisia tabaci*、甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua*、棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 等多种昆虫中开展了广泛深入的研究工作, 目前已发表的关于昆虫 RNAi 的论文数量位列世界第二位。我国科学家应用 RNAi 技术揭示了多个与昆虫重要生物学现象和行为相关的关键基因功能及其分子机制, 发展了基于 RNAi 介导的转基因抗虫作物等多种害虫控制新方法, 并探索了不同昆虫中 RNAi 作用的分子机制。这些研究表明 RNAi 技术对于中国昆虫学研究的发展起到了重要的推动作用。本文综述了 RNAi 技术在我国昆虫学研究领域近 20 年来的发展与应用, 并对当前存在的问题及未来发展方向进行了展望, 包括靶标基因筛选、RNAi 效率评价标准、RNAi 技术与传统害虫防治方法的联合应用模式以及昆虫 RNAi 作用机制等方面, 以期更好地推动 RNAi 技术在我国昆虫学研究和害虫防治领域的发展。

关键词 昆虫; RNAi; 基因功能; 害虫控制; RNAi 机制

Progress in RNAi technology, and prospects for its application, in entomological research in China

TIAN Hong-Gang^{1**} LIU Tong-Xian¹ ZHANG Wen-Qing^{2***}

(1. State Key Laboratory of Crop Stress Biology for the Arid Areas, Key Laboratory of Northwest Loess Plateau Crop Pest Management of Ministry of Agriculture, Northwest A&F University, Yangling 712100, China;
2. State Key Laboratory of Biocontrol, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract RNAi was discovered more than 20 years ago and Chinese entomologists have used this technology to conduct extensive and in-depth research on many insect species, including *Nilaparvata lugens*, *Locusta migratoria*, *Acyrtosiphon pisum*, *Bemisia tabaci*, *Spodoptera exigua* and *Helicoverpa armigera*. Up to now, Chinese publications on insect RNAi have ranked second in the world. The application of RNAi technology in China has revealed a great number of key gene functions and molecular mechanisms related to important biological phenomena and insect behaviors. A variety of pest control methods have been developed based on RNAi-mediated, beyond transgenic, insect-resistant, RNAi crops. The molecular mechanisms of RNAi in different insects has also been explored. Current studies indicate that RNAi technology has played an important role in promoting the development of Chinese entomological research. This paper reviews the development and application of RNAi technology in entomological research in China over the past 20 years, including current problems and directions for future development. We suggest that the application of RNAi technology in entomological research will be promoted by further work on RNAi target gene screening, the evaluation of RNAi efficiency, the joint application of RNAi technology and traditional pest control methods, and better understanding of the mechanisms underlying insect RNAi

*资助项目 Supported projects: 国家重点研发计划 (2017YFD0200900); 国家自然科学基金 (31101432)

**第一作者 First author, E-mail: tianhg@nwsuaf.edu.cn

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

收稿日期 Received: 2019-06-03; 接受日期 Accepted: 2019-07-03

and insect pest control in China.

Key words insects; RNAi; gene function; insect pest control; RNAi mechanism

自 1998 年 Andrew Fire 和 Craig Mello 在秀丽杆线虫 *Caenorhabditis elegans* 中发现 dsRNA (Double-stranded RNA) 可以特异性并高效地诱导生物体内靶标基因 mRNA 沉默以来 (Fire *et al.*, 1998), 主要基于 dsRNA/siRNA (Small interfering RNA) 的 RNAi (RNA interference) 技术已广泛地应用于真菌、植物、动物等多种真核生物基因功能研究之中。RNAi 技术由于其简便、高效和相对较好的特异性, 极大地推动了对多种生物特别是非模式生物基因功能的解析, 而且在农业和医学中还发展出了基于 RNAi 原理的农业有害生物控制技术和治疗人类疾病的新颖药物。例如孟山都公司研发的表达靶向玉米根甲虫 *Diabrotica virgifera virgifera* 的 *DvSnf7* 基因 dsRNA 的 RNAi 转基因玉米 SmartStax Pro[®] 已经获得美国农业部 (USDA) 和环保署 (EPA) 批准, 即将开展商业化应用 (Head *et al.*, 2017); Alnylam Pharmaceuticals 研发的用于治疗由遗传性转甲状腺素蛋白淀粉样变性引起的周围神经性疾病的 siRNA 药物 Onpattro 成为世界首款由美国食品药品监督管理局 (FDA) 批准的 RNAi 疗法药物 (Garber, 2018)。这显示了 RNAi 技术在生物学基础和应用研究领域的巨大潜力。

昆虫作为自然界种类最多且与人类联系最为密切的动物类群之一, 随着越来越多昆虫基因组数据的发布, 理解昆虫基因的功能和研发新的害虫控制技术具有重要的价值 (Li *et al.*, 2019)。然而长期以来由于技术手段有限, 对于昆虫基因功能的深入研究仅局限在果蝇和蚊子等少数模式昆虫的研究。RNAi 技术的诞生在非模式昆虫基因功能研究和害虫防治新技术的探索方面发挥了重要作用, 在我国昆虫学研究的发展之中也起到了重要推动作用。例如浙江大学张传溪教授团队应用 RNAi 技术阐明了褐飞虱 *Nilaparvata lugens* 长短翅型分化的分子开关 (Xu *et al.*, 2015), 中国科学院上海生命科学研究院陈晓亚

院士团队发现转基因 RNAi 植物可以抑制棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 的发育 (Mao *et al.*, 2007)。在美国国家健康研究院 (National Institute of Health, NIH) 国家医学图书馆 PubMed 上以 “insect” 和 “RNAi” 作为关键词检索可以发现, 目前全世界已发表相关论文 3 908 篇, 我国昆虫学家参与发表的论文有 718 篇, 占有论文的 18.37%; 这一方面表明了 RNAi 技术在昆虫学研究领域的广泛应用, 另一方面也说明了我国昆虫学家在此领域的重要贡献。本文将重点就 RNAi 技术在我国昆虫学研究领域近 20 年的主要进展和国际上的发展趋势展开综述, 同时对目前昆虫 RNAi 研究中存在的关键问题与未来发展方向进行了展望。

1 RNAi 技术在我国昆虫学研究中的主要进展

我国昆虫学家应用 RNAi 技术在多种昆虫中主要开展了基因功能、害虫防治和 RNAi 作用机制等方面的研究工作, 取得了一系列重要的发现。在 PubMed 上进行文献分析表明, 近 20 年来我国科学家在昆虫 RNAi 研究领域每年发表的学术论文数量从 1999 年的 0 篇增长至 2018 年的 118 篇, 特别是近 10 年来增长迅速 (图 1); 美国已发表 1 255 篇, 我国所发表的 718 篇论文已占美国总量的 57.21%; 德国、日本、英国和法国分别已发表 278、264、194 和 141 篇, 我国的论文数量已占这四个国家总和的 81.87%。这些数据表明 RNAi 技术在我国昆虫学领域近 20 年取得了快速的应用和发展, 相关研究论文的数量已经居于世界第二位, 整体研究已经接近世界先进水平。

1.1 RNAi 技术在昆虫基因功能研究中的应用

RNAi 技术在昆虫学中的应用主要集中在基因功能的研究方面, 许多与昆虫发育调控相关的重要基因功能应用 RNAi 技术而得到阐明。昆虫

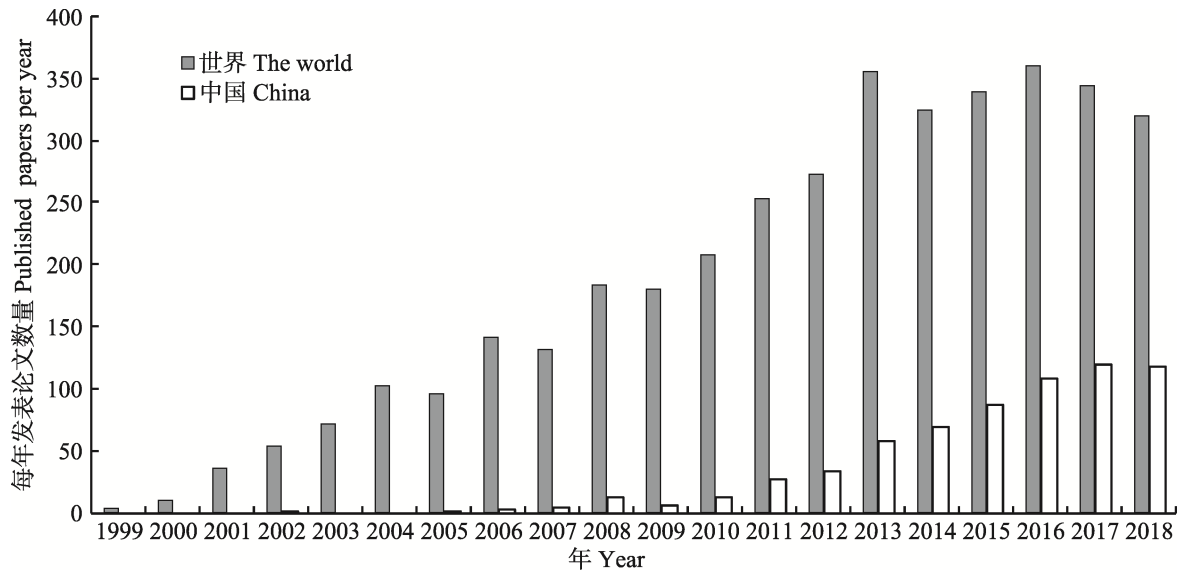


图1 我国与世界昆虫 RNAi 相关研究论文数量统计与比较 (1999-2018)

Fig. 1 Comparison of published papers about insect RNAi between the whole world and China (1999-2018)

是无脊椎动物中唯一具有飞行能力的类群,翅是昆虫获得这一重要能力的关键。水稻重大害虫褐飞虱 *N. lugens* 通常具有长翅和短翅两种翅型,其翅型的分化在褐飞虱对水稻的危害之中起到了重要作用,而其调控的机制却长期不明。张传溪教授团队应用 RNAi 技术在褐飞虱研究中发现两个胰岛素受体 InR1 和 InR2 决定了褐飞虱的翅型分化,首次从分子水平上揭示了昆虫翅型分化的机制,解决了困扰学界多年的难题(Xu *et al.*, 2015)。这项研究被评为 2015 年度“中国生命科学领域十大进展”之一(张传溪 *et al.*, 2016)。蝗虫的群居型和散居型分化是其爆发成灾的重要原因之一,康乐院士团队利用 RNAi 技术在飞蝗 *Locusta migratoria* 中揭示了这种生物型变行为的分子机理,发现蝗虫聚群行为受到多巴胺信号通路的调控,近期还发现群居蝗虫以苯乙腈(PAN)为防卫武器抵御入侵者的捕食(Ma *et al.*, 2011; Wang and Kang, 2014; Wei *et al.*, 2019)。蜕皮和变态是昆虫重要的生物学特性,但长期以来对其调控机理却了解甚少。李胜教授团队在果蝇 *Drosophila melanogaster* 中利用 GAL4/UAS 介导的 RNAi 技术发现,在幼虫环腺(ring gland, RG)中保幼激素(Juvenile hormone, JH)和蜕皮激素 20E

(20-hydroxyecdysone)通过互相控制对方的合成来达到调控昆虫变态的目标(Liu *et al.*, 2018)。冯启理教授团队在家蚕 *Bombyx mori* 中利用 RNAi 技术发现,POUM2 与同源结构域转录因子 Abd-A 蛋白互作调控了蛹期相关基因的转录从而使家蚕完成了从幼虫到蛹期的变态发育(Deng *et al.*, 2012)。赵小凡教授团队在棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 应用了 RNAi 技术发现蛋白激酶 C delta (Protein kinase C delta, PKC δ)可以磷酸化昆虫蜕皮激素 20E 的细胞核受体,从而促进了幼虫到蛹的发育过程(Chen *et al.*, 2017)。许多刺吸式口器的昆虫通过直接取食并传播病毒病对植物造成重大危害,王晓伟教授和刘树生教授团队利用 RNAi 技术发现双生病毒衣壳蛋白和烟粉虱 *Bemisia tabaci* 卵黄蛋白的互作决定了病毒的传播(Wei *et al.*, 2017);此外,他们还发现烟粉虱唾液蛋白 Bt56 通过与烟草中的一个转录因子 NTH202 在韧皮部互作,诱导水杨酸积累来降低植物对其抗性从而有利于自身的生长(Xu *et al.*, 2019)。E- β -法尼烯(E- β -farnesene, EBF)是许多蚜虫类的报警信息素,但是对于 EBF 信号接收的细胞和分子机制长期以来并不清楚;王桂荣研究员团队利用 RNAi 技术在豌豆蚜 *Acyrtosiphon pisum* 中发现

抑制嗅觉受体 ApisOR5 和嗅觉结合蛋白 ApisOBP3 与 ApisOBP7 的表达后, 蚜虫对 EBF 产生的驱虫行为消失, 证明了 ApisOR5 是 EBF 接收的关键受体 (Zhang *et al.*, 2017b)。表皮是保护昆虫内部器官和外界环境之间的重要屏障, 几丁质是昆虫表皮的重要组成物质, 张建珍教授团队和作者实验室分别在飞蝗 *L. migratoria* 和甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* 中应用 RNAi 技术系统研究了昆虫表皮和几丁质合成代谢途径中多个关键基因的功能, 为深入理解昆虫几丁质合成代谢并探索新的害虫控制靶标基因奠定了基础 (Zhu *et al.*, 2016)。上述研究绝大多数都是我国研究人员在非模式昆虫中开展的, 进一步表明了 RNAi 技术在促进昆虫基因功能研究和探索昆虫发育与生物学行为的分子机制中起到了重要的作用。

1.2 RNAi 技术在害虫控制中的应用

RNAi 技术不仅在昆虫基因功能研究中起到了重要的推动作用, 而且在害虫控制中显示出重要价值。由于其有效性和潜在靶标基因的多样性, RNAi 被誉为新一代害虫防治新技术, 在害虫控制新技术发展中展示出巨大的应用潜力 (Zhang *et al.*, 2017a)。

1.2.1 昆虫 RNAi 靶标基因的筛选 根据 RNAi 作用的基本原理, 理论上而言目标昆虫的任何基因都有可能作为靶标基因。然而实际上并非所有基因都可以作为具有控制害虫潜力的基因, 只有那些对于昆虫生长发育特别重要的基因才有可能作为潜在的杀虫靶标基因。考虑到 RNAi 作用方式的特点, 在幼虫和成虫发育时期的关键基因更有可能作为候选的致死基因, 因为卵或蛹是昆虫表面不活动的状态, 这两个时期都不会发生取食行为, 且在自然界中其一般位于较隐蔽的地方, 此外作为生物大分子的 dsRNA 也无法通过取食或表面接触的方式在这两个发育时期进入虫体内来诱导 RNAi。因此, 在重要害虫中筛选具有致死作用的靶标基因是将 RNAi 技术应用于害虫控制的关键之一。在 RNAi 作用过程中 dsRNA 靶向的最终目标分子是 mRNA, 由于昆

虫与人类和哺乳动物在进化上存在许多共性, 这也表现在核酸 (DNA 和 RNA) 水平上, 因此靶标基因的筛选不仅要考虑到能够杀死害虫, 同时还要确保对非靶标生物如人类和哺乳动物等的安全性, 避免脱靶效应 (Off-target effects) 对非目标生物的潜在危害等。例如作者实验室围绕合成昆虫表皮几丁质的相关基因做了一系列工作, 几丁质是昆虫表皮结构的重要组成部分, 同时其在哺乳动物中又不存在, 从而从理论上确保了其对非靶标生物的安全性, 因此与昆虫几丁质合成相关的基因均是理想的杀虫靶标基因, 我们通过研究发现几丁质合成酶 CHS-A 具有作为杀虫靶标基因的潜力 (Chen *et al.*, 2008; Tian *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2017)。昆虫 RNAi 研究中靶标基因 dsRNA 的导入方式主要有注射和饲喂两种, 因此在致死基因的筛选过程中也主要采用了这两种方法。靶标基因的筛选方法主要包括 (1) 全基因组筛选, 主要是针对完成全基因组序列的昆虫, 如果蝇 *D. melanogaster* 和赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* 等; (2) 根据在其他模式昆虫中已经发现的基因序列进行同源比对, 在目标昆虫中进行验证, 绝大多数研究都属于此类; (3) 根据昆虫生长发育所需的关键信号通路筛选相关基因。我国研究人员筛选靶标基因更多的是后两种方法。为了避免对非靶标生物产生脱靶效应, 还应该将目标序列与人类及主要哺乳动物的基因序列进行比对, 从理论设计上确保靶标基因的安全性。苗雪霞研究员团队在亚洲玉米螟 *Ostrinia furnacalis* 中发现, 利用联合饲喂 CTP16 dsRNA 和 Bt 蛋白的方法在 5 d 内可以导致棉铃虫 100% 的死亡 (Guan *et al.*, 2017)。张友军研究员团队发现通过注射或饲喂高剂量的 dsRNA 抑制小菜蛾 *Plutella xylostella* 中 PxABCH1 基因的表达可以导致幼虫和蛹的死亡, 且幼虫期死亡率可以达 90% 以上 (Guo *et al.*, 2015)。夏兰琴研究员团队在麦长管蚜 *Sitobion avenae* 中利用饲喂 RNAi 方法筛选发现, 靶向 Unigene_23028 基因的低剂量 dsRNA (7.5 ng/ μ L) 即可引起近 90% 的死亡率 (Zhang *et al.*, 2013)。作者实验室利用注射和饲喂 RNAi 的方法在褐飞虱 *N. lugens*

和甜菜夜蛾 *S. exigua* 中发现 EcR 和 CHSA 等基因具有控制害虫的潜力,褐飞虱对 RNAi 敏感性较好,但是在甜菜夜蛾中发现即使从 1 龄幼虫期开始连续饲喂高剂量表达 dsRNA 的细菌也仅能在饲喂 9 d 后导致其校正死亡率达到 20% 左右,且靶标基因的沉默效率与导入 dsRNA 的剂量密切相关 (Tian *et al.*, 2009; Yu *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2017)。我们的研究和许多在其他昆虫中开展的相关研究均表明靶标基因 dsRNA 剂量对 RNAi 效率具有重要的影响,因此在对许多昆虫 RNAi 研究中通常采用了高剂量 dsRNA 来开展实验。但是考虑到在实际应用中(植物介导的 RNAi 或体外喷洒 dsRNA)往往很难达到高剂量 dsRNA,所以还应该研究靶标基因在不同 dsRNA 浓度梯度下对目标昆虫的影响,尽可能筛选一些在低剂量条件下可诱导害虫死亡且相对安全的靶标基因,这对于 RNAi 技术应用于害虫控制具有更直接的参考价值。这些研究还表明,不同昆虫对 RNAi 的敏感性和靶标基因的具体作用均存在差异,必须对目标害虫的特定基因进行详细的研究,以确保筛选到的致死靶标基因作用效果的可靠性,为后续的田间试验奠定坚实的基础。

1.2.2 RNAi 导入方法 昆虫靶标基因的沉默效率依赖于进入表达目标基因细胞内 dsRNA 分子的数量,在具体昆虫及目标基因确定的情况下,有效导入的 dsRNA 分子的剂量是影响 RNAi 效率最关键的因子。注射法虽然是有效的 RNAi 导入方法之一,但是明显其不适用于害虫的田间控制。现有研究表明,昆虫通过自然取食的方式将 dsRNA 摄入体内的方法是最具潜力的可用于害虫控制的方式,因此本部分重点阐述通过饲喂诱导 RNAi 的方式。

1.2.2.1 植物介导的 RNAi 抗虫作物 通过植物表达目标害虫关键基因的 dsRNA 来抑制害虫的发育是基于 RNAi 保护作物最有效和具备应用潜力的方式,目前即将开展商业化种植的抗玉米根甲虫 *D. virgifera virgifera* 的转基因玉米的即是基于植物介导的表达 DvSnf7 dsRNA 的方式 (Head *et al.*, 2017)。陈晓亚院士团队于 2007 年利用植物表达靶向棉铃虫 *H. armigera* 的 P450

基因 CYP6AE14 的 dsRNA,发现取食表达 dsRNA 植物的棉铃虫不仅其体内靶标基因的表达被降低,同时昆虫的发育也受到了阻碍并且对于棉籽酚 (Gossypol) 耐受性降低 (Mao *et al.*, 2007)。在该论文发表的同期杂志上来自美国孟山都公司的研究人员也报导了饲喂玉米根甲虫 *D. virgifera virgifera* 表达其相应 dsRNA 的转基因玉米会抑制其幼虫的发育并导致死亡 (Baum *et al.*, 2007)。在这两项突破性研究之后,利用植物表达昆虫基因的 dsRNA 来控制害虫逐渐成为一个具有巨大应用潜力的害虫控制方向,国内多个研究团队在利用不同植物介导的 RNAi 害虫控制方法探索方面也做了许多卓有成效的工作。然而多项研究表明,虽然植物介导的 RNAi 可以抑制多种昆虫基因的表达,但是对许多昆虫的实际控制效率并不高。影响 RNAi 效果的一个重要原因可能是在植物中表达的昆虫 dsRNA 一部分会被植物细胞质内的 Dicer 酶加工成 siRNA,从而昆虫通过取食进入到其体内的有效 dsRNA 分子数量减少 (Zhang *et al.*, 2017a),而 siRNA 一般在昆虫体内较难诱导 RNAi 反应 (Wang *et al.*, 2013),最终表现出绝大多数植物介导的 RNAi 对害虫实际控制作用较弱的现象。张江教授发展出一种利用植物叶绿体 DNA 转化表达 dsRNA 的方式,其效果要远优于普通的细胞核转化方式。由于植物叶绿体之中缺乏 Dicer 酶,从而使表达的长链 dsRNA 能够不被切割而在植物细胞内不断累积,最终达到沉默昆虫靶标基因所需足够量的 dsRNA 分子 (Zhang *et al.*, 2015)。在植物质体 (Plastid) 中表达 dsRNA 的全新方法,克服了传统细胞核转化方式的缺陷,有效提升了昆虫可摄取的 dsRNA 分子数量,将会显著增强 RNAi 作物对咀嚼式口器和一些能够进行细胞取食的刺吸食口器害虫的控制效果。

1.2.2.2 微生物表达 dsRNA 实验室中通常使用的 dsRNA 都是采用 RNAi 试剂盒来合成,但试剂盒高昂的价格则阻碍了其应用的范围。将可以表达靶标基因 dsRNA 的重组载体转入细菌、真菌等微生物中则能够方便获得大量的 dsRNA,从而极大地降低 dsRNA 的成本。作者实验室采

用表达 dsRNA 的质粒 L4440 在 RNase III 缺失型的细菌 HT11 Δ (DE3) 中表达了甜菜夜蛾 *S. exigua* 的 CHSA 基因的 dsRNA, 通过从 1 龄幼虫开始连续饲喂高浓度表达 dsRNA 的细菌发现目标基因的表达可以被抑制, 并且能够引起幼虫产生蜕皮障碍的表型 (Tian *et al.*, 2009)。现在多个实验室在不同昆虫中的研究都证明了这个方法的有效性 (Zhu *et al.*, 2011, 2012; Vatanparast and Kim, 2017)。此方法特别适合 dsRNA 的工业化生产, 同时也可以直接喷施表达 dsRNA 细菌用于防治对 RNAi 敏感的食叶类咀嚼式口器害虫 (Zotti *et al.*, 2017)。冉春研究员团队利用昆虫病原真菌 *Lecanicillium attenuatum* 表达靶向柑橘粉虱 *Dialeurodes citri* 免疫相关基因 DcPPO、DcPPO-AF 和 DcLZM 的 dsRNA, 显著增强了病原真菌对柑橘粉虱的致病力 (Yu *et al.*, 2019)。朱祯研究员团队利用昆虫核型多角体病毒 HearNPV 表达靶向棉铃虫 *H. armigera* 的 JH 相关基因 dsRNA, 显著缩短了杆状病毒对昆虫致死所需的时间, 提升了杀虫效率 (Liu *et al.*, 2019)。这些研究充分说明利用微生物表达 dsRNA 对于害虫控制具有重要价值。

1.2.2.3 纳米材料介导的 RNAi RNAi 技术在实际应用中遇到的一个关键难点就是 dsRNA 在自然条件下稳定性较低、在体外或生物体内极易被降解, 从而失去生物活性。这虽然间接性说明了 RNAi 制品不易有残留、生物安全性较高的优势, 但对于田间的实际应用来说却增加了很大的阻碍。沈杰教授团队研发出一种阳离子核壳荧光纳米粒子 (FNP), 这种粒子具有纳米尺寸、可高效携带核酸 (DNA 和 RNA), 将这种纳米载体与靶向亚洲玉米螟 *O. furnacalis* 几丁质酶基因的 dsRNA 混合饲喂, 发现提升了 dsRNA 进入昆虫细胞的效率, 目标基因被抑制后导致昆虫不能蜕皮直至死亡 (He *et al.*, 2013); 最近他们还开发出一种针对蚜虫的可携带 dsRNA 的纳米材料, 可直接通过蚜虫表皮吸收 dsRNA 达到杀虫目的 (Zheng *et al.*, 2019)。

1.2.3 影响昆虫 RNAi 效率的机制 现有的多项研究表明, RNAi 在所有真核生物细胞内的机

制是相对比较保守的, 然而通过 dsRNA 或 siRNA 在不同生物体内诱导 RNAi 的效率却存在着很大差异。在昆虫中的研究发现, 赤拟谷盗 *T. castaneum* 等鞘翅目昆虫、飞蝗 *L. migratoria* 等直翅目昆虫和德国小蠊 *Blattella germanica* 等蜚蠊目昆虫对 RNAi 相对敏感, 仅需少量的 dsRNA 即可诱导较强的基因沉默效果; 而其他占害虫主要类群的鳞翅目和半翅目等多种昆虫中通常需要高剂量的 dsRNA 才能诱导 RNAi, 且基因抑制效率相对较低 (Terenius *et al.*, 2011; Garbutt *et al.*, 2013; Scott *et al.*, 2013; Ivashuta *et al.*, 2015)。这即说明不同昆虫 RNAi 作用机制存在的较大的差异。

1.2.3.1 降解 dsRNA 的核酸酶 当前对多种昆虫的研究发现, 存在于血淋巴或肠道内可快速降解 dsRNA 的核酸酶可能是影响不同昆虫 RNAi 效率的关键之一。韩召军教授团队在美洲大蠊 *Periplaneta americana*、大麦虫 *Zophobas atratus*、飞蝗 *Locusta migratoria* 和斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* 等 4 种昆虫之中导入靶向各自几丁质酶基因的 dsRNA (分别为每头昆虫 1.0、2.3、1.5 和 33.0 μ g), 发现相应的基因沉默效率分别为 82%、78%、76% 和 20%, 综合分析发现不同昆虫 RNAi 效率与其体内降解 dsRNA 的酶类活性密切相关 (Wang *et al.*, 2016), 进一步分析发现不同昆虫 dsRNA 降解酶的活性还受不同生理条件所调节 (Peng *et al.*, 2018)。苗雪霞研究员团队在亚洲玉米螟 *O. furnacalis* 中利用转录组分析的方法鉴定到一个鳞翅目昆虫特异性的核酸酶 up56, 抑制 up56 基因的表达显著增强了玉米螟 RNAi 的效率 (Guan *et al.*, 2018b), 进一步深入分析表明玉米螟体内核酸酶对导入的 dsRNA 切割具有碱基偏好性, 其 siRNA 通常被切割为在 5' 或 3' 端保留 GGU 的残基, 而在赤拟谷盗 *T. castaneum* 中被加工之后的 siRNA 残基位点多样性更高 (Guan *et al.*, 2018a)。张建珍教授团队在飞蝗 *L. migratoria* 之中研究发现, 核酸酶基因 LmdsRNase2 是肠道之中降解 dsRNA 的关键酶, 证明该基因是导致飞蝗对饲喂 RNAi 不敏感的重要原因之一 (Song *et al.*, 2017)。上述的研究表

明昆虫血淋巴和肠道内的核酸酶对 RNAi 效率具有重要影响, 鉴定不同昆虫体内降解 dsRNA 的关键是核酸酶基因, 对于更深入理解昆虫 RNAi 作用机制具有重要意义。

1.2.3.2 dsRNA 进入靶标细胞的途径 靶标基因 mRNA 的有效沉默依赖于进入目标组织细胞内的 dsRNA 分子数量, 因此 dsRNA 是通过何种途径进入到靶标细胞内对于 RNAi 的诱导具有至关重要的作用。在秀丽杆线虫 *Caenorhabditis elegans* 中的研究表明, 肠道特异性跨膜蛋白 SID-2 在 SID-1 存在的情况下通过胞吞 (Endocytosis) 作用将外源的 dsRNA 运送到细胞内, 然后 dsRNA 在 SID-1 跨膜通道蛋白的作用下将 RNAi 信号在细胞之间进行传递, SID-1 可以将 dsRNA 从胞外带入胞内, 但是在 dsRNA 运出细胞外的过程中却没有作用 (Feinberg and Hunter, 2003; Winston *et al.*, 2007; Jose *et al.*, 2009; Whangbo *et al.*, 2017)。在昆虫中没有发现与 SID-2 类似的基因, 但在除果蝇等双翅目之外的其他昆虫中都发现了与 SID-1 同源或 SID-1 类似 (SID-1 like) 的基因 (Chan and Snow, 2016)。然而康乐院士团队的研究发现 SID-1 与飞蝗系统性 RNAi 并不相关, 导入外源 dsRNA 之后飞蝗体内 SID-1 基因的表达并未相应上调, 抑制 SID-1 的表达之后也不会对飞蝗 RNAi 效率产生显著影响 (Luo *et al.*, 2012)。但在马铃薯甲虫 *Leptinotarsa decemlineata* 的研究却发现 2 个 SID-1 like 基因 silA 与 silC 都参与了细胞内 dsRNA 的输入与传递, 此外还发现网格蛋白调节的胞吞作用 (Clathrin-mediated endocytosis) 也参与了 RNAi 过程 (Cappelle *et al.*, 2016)。这说明依赖于 SID-1 通道的系统性 RNAi 在昆虫中并不是普遍保守的, 不同的昆虫可能会利用不同的途径将 dsRNA 运送入细胞内。同时, 即使在一些较易诱导 RNAi 的昆虫之中也有一些组织表现出对 dsRNA 敏感性不佳, 例如神经系统和生殖系统对外源 dsRNA 一般都具有一定的抵御性。周树堂教授研究团队在飞蝗 *L. migratoria* 中发现, 虽然飞蝗对注射 RNAi 比较敏感, 然而其卵巢中 RNAi 似乎完全不能被诱

导。进一步研究发现, 虽然 dsRNA 可以穿过卵巢鞘 (Ovariole sheath), 但是却无法进入卵泡细胞 (Follicle cells) 和卵母细胞 (Oocytes), 这可能是在卵巢中无法诱导 RNAi 的关键原因 (Ren *et al.*, 2014)。上述研究说明 RNAi 机制在不同昆虫以及同种昆虫的各器官和组织间均存在差异, 明确不同昆虫 RNAi 作用的机制将有助于提升 RNAi 效率, 以促进该技术在更多昆虫中的有效应用。

2 RNAi 技术在国际昆虫学研究领域的进展与趋势

从以上的叙述可以看出 RNAi 技术近 20 年来在我国昆虫学各领域和方向均取得了很大发展, 然而与国际同行相比我们的研究水平依然存在差距。以 PubMed 上可检索到的近 20 年与昆虫 RNAi 研究相关的论文为例, 虽然我国研究人员已发表的论文数量已位列世界第二位, 但是如果以发表在世界高水平学术期刊 Nature、Science、Cell 和 PNAS 上的论文数统计, 截至当前我国科学家则分别发表了 1、0、0 和 10 篇, 而美国科学家则分别发表了 10、16、23 和 66 篇论文, 这些数据表明我们在昆虫 RNAi 基础研究领域与美国依然存在较大差距。

在利用 RNAi 对昆虫与生长发育相关的基因功能研究方面, 国际同行已不局限于仅对单个或少数几个基因的功能开展研究, 他们已应用大规模 RNAi 筛选 (Large scale RNAi screen) 的方法对特定昆虫的全基因组进行功能研究。在果蝇 *D. melanogaster* 和赤拟谷盗 *T. castaneum* 中研究人员利用 RNAi 筛选的方法, 鉴定了一批与昆虫胚胎发育、胚后发育、生理与细胞生物学相关的重要基因功能 (Bai *et al.*, 2011; Schmitt-Engel *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2016; Hassan *et al.*, 2018; Schultheis *et al.*, 2019), 并揭示了多个可用于害虫防治的新靶标基因 (Knorr *et al.*, 2013; Dönitz *et al.*, 2015; Ulrich *et al.*, 2015)。例如在赤拟谷盗 *T. castaneum* 中, 利用 RNAi screen 的方法鉴定了 111 个非感受性

(Non-sensory) 的 G 蛋白偶联受体 (G-protein coupled receptors, GPCRs) 基因, 发现注射靶向其中 8 个 GPCRs 基因的 dsRNA 严重影响了赤拟谷盗幼虫的发育并导致蜕皮障碍, 包括多巴胺 2 类受体 (Dopamine-2 like receptor) TC007490/D2R 和蛛毒素受体 (latrophilin receptor) TC001872/Cir1, 注射 TC007490/D2R dsRNA 的许多幼虫无法完成化蛹而死亡, 表明了 GPCR 对昆虫生长发育的重要作用以及作为新型杀虫剂靶标的潜力 (Bai *et al.*, 2011)。以上的研究说明在害虫拥有全基因组的条件下, 通过大规模 RNAi 筛选的方法可以发现更多新的有潜力的靶标基因, 这将会有力地扩充 RNAi 技术可供利用的基因资源, 为后续 RNAi 作物和产品的研发奠定坚实基础。

在基于 RNAi 的害虫防治技术发展方面, 孟山都公司等研发的 RNAi 抗虫玉米已完成了杀虫机理、安全性评价及一系列田间试验, 这也是世界首个即将开展商业化种植的转基因 RNAi 抗虫作物 (Ramaseshadri *et al.*, 2013; Dubelman *et al.*, 2014; Petrick *et al.*, 2016; Head *et al.*, 2017)。这种转基因玉米 (MON87411) 表达了 Snf7 dsRNA, Snf7 属于 ESCRT (Endosomal Sorting Complex Required for Transport)-III 复合体中囊泡分选蛋白 E 类的一员, 其对于跨膜蛋白的分选非常重要 (Ramaseshadri *et al.*, 2013)。实验表明其不仅可以有效杀死玉米根甲虫 *D. virgifera virgifera*, 且对蜜蜂 *Apis mellifera* 等非靶标生物没有明显毒性作用 (Tan *et al.*, 2016)。在 3 种不同来源土壤中的实验发现 90% Snf7 dsRNA 35 h 内就会被降解, 2 d 后基本无法被检测到 (Dubelman *et al.*, 2014), 这进一步说明了 RNAi 抗虫作物环境友好和生物安全性高的优点。然而, 就像现有的害虫会对长期使用的杀虫剂产生抗性一样, 如果随着 RNAi 作物的长期种植昆虫肯定也会逐渐产生类似的抗性。为了进一步理解这些潜在的抗性及其机制, 孟山都公司在实验室内通过连续多代筛选建立了一个抗 Snf7 dsRNA 的玉米根叶甲种群, 研究发现这个抗性种群昆虫的肠道不能有效吸收通过取食获得的

Snf7 dsRNA, 而且对其他基因的 dsRNA 也产生了普遍抗性, 遗传分析表明其由位于常染色体上 LG4 位点的隐性基因所控制, 但是通过与敏感种群的杂交这些抗性品系又可以恢复对 RNAi 的敏感性 (Khajuria *et al.*, 2018)。这项研究表明, 转基因抗虫作物应用时要注意同时建立庇护植物 (Refuge plantings), 并联合其他抗虫方式对害虫进行综合治理, 以延长 RNAi 抗虫作物的有效使用时间。

同时由于 RNAi 效率在不同昆虫中表现出的巨大差异性, 国际同行也对不同昆虫的 RNAi 作用机制展开了深入研究。对马铃薯甲虫 *L. decemlineata* 的研究发现, 抑制其体内核酸酶的活性可以提升虫体对 dsRNA 的敏感性并增强对马铃薯的保护, 而抑制沙漠蝗 *Schistocerca gregaria* 中的相应核酸酶对 RNAi 效率的提升却没有显著作用 (Spit *et al.*, 2017), 这说明不同昆虫中核酸酶对其 RNAi 效率的影响存在差异。最近在马铃薯甲虫 *L. decemlineata* 和赤拟谷盗 *T. castaneum* 的研究还发现, 一种鞘翅目特异性的 dsRNA 结合蛋白 Staufen C 在 dsRNA 被切割成 siRNA 过程中起到了重要作用, Staufen C 表达量低的细胞一般对 RNAi 表现出较高的抗性 (Yoon *et al.*, 2018)。此外, 为了增强 dsRNA 在应用之中的稳定性, 澳大利亚科学家还研发出了一种无毒性并可降解的层状双氢氧化物 (Layered double hydroxide, LDH) 粘土纳米材料, 将 dsRNA 与 LDH 搭载后其稳定性显著增强, 喷洒在叶片上的 dsRNA 不仅耐冲刷而且稳定期长达 30 d (Mitter *et al.*, 2017)。为了降低 dsRNA 的应用成本并促进其可用性, 国际同行也不断发展并优化利用细菌、酵母、病毒和昆虫共生微生物等表达 dsRNA 的方式, 以推动 RNAi 抗虫产品的实际应用 (Whitten *et al.*, 2016; Mysore *et al.*, 2017; Zotti *et al.*, 2017)。从上述领域的进展可以看出, 国际同行已不仅局限于利用 RNAi 技术对昆虫基因功能或者开展一些小型的实验室内抗虫研究工作, 许多国际知名的生物技术公司也深度参与其中并致力于将 RNAi 抗虫

作物或产品推向商业化应用,以解决农业实际生产中遇到的害虫控制问题。

3 展望

RNAi 作为一种简便高效的基因沉默技术,近 20 年来在促进我国科研人员对昆虫重要生物学现象与行为的分子机制的理解和发展环境友好型的 RNAi 害虫控制技术方面起到了重要的推动作用,然而作者认为昆虫 RNAi 研究领域当前依然存在以下主要问题与挑战,对这些关键问题的解决将有助于推动 RNAi 技术的发展。

将 RNAi 技术应用于害虫控制一个关键点就是要找到合适的靶标基因,因为许多重大害虫其生物学特性存在较大的差异,因此必须对具体的害虫进行研究以明确其合适的靶标基因。前期的许多研究主要集中在筛选害虫致死基因,然而由于 RNAi 作物或产品最终的施用对象通常是我们人类食物来源的作物,所以我们还必须至少从理论上确保这些基因尽可能不会对人类以及害虫的天敌产生不利影响,在确保杀死害虫的前提下对非靶标生物的安全性必须要考虑。同时,由于在田间应用 RNAi 技术控制害虫过程中,无论是通过植物介导还是直接喷施的 dsRNA 均无法达到在实验室条件下的高剂量,因此在靶标基因的筛选过程中还必须考虑到 dsRNA 剂量对害虫致死效应的影响,关键靶标基因筛选必须要进行 dsRNA 剂量梯度实验,需要尽可能的筛选到在低剂量 dsRNA 条件下对害虫具有致死性作用的基因,确保靶标基因在田间实际害虫控制中应用的有效性。

当前的研究表明 RNAi 效率在不同昆虫或同种昆虫的不同基因方面展现出很大的差异,然而由于昆虫种类众多,我们还缺乏对不同昆虫 RNAi 效率进行客观评价的标准。RNAi 诱导的基因沉默一个显著的特征就是靶标基因 mRNA 表达水平的降低,通常利用 qRT-PCR 来对目标基因进行检测,但是这个检测结果受到导入的 dsRNA 剂量、作用时间、取样方式、实验样本量、重复次数、引物扩增效率和内参基因的选择等一系列关键因子的影响,由于缺乏相应的标

准,所以更多时候我们对 RNAi 效率的高低更多的基于定性评价而非定量的分析比较。对于筛选致死基因而言,由于昆虫个体大小、发育时期、dsRNA 剂量、作用时间和导入方式各异,单一的死亡率也很难说明问题,不同实验结果之间更难进行比较。因此,综合考虑各关键因子并建立相对客观的 RNAi 效率评价标准显得尤为重要。

根据 RNAi 作用的特点来看,靶标基因的 dsRNA 分子必须首先到达昆虫的特定组织器官,然后才能进入相应细胞内找到并降解靶标基因 mRNA。这期间 dsRNA 不仅要面对肠道和血淋巴中核酸酶对其一些分子的降解,而且靶标基因的有效沉默也需要一定的时间。因此 RNAi 控制害虫的方式与昆虫生长调节剂的作用特点类似,无法做到快速杀死目标害虫,只能通过调控其发育而使害虫缓慢死亡。而且根据现有的诸多研究结果来看, RNAi 对许多昆虫的实际控制效果还比较弱,因此 RNAi 技术必须与现有的害虫防治方法进行联合使用,例如将 RNAi 与高效低毒的化学杀虫剂、微生物杀虫剂、昆虫信息素以及天敌昆虫等生物防治方法综合应用,才有可能克服在田间单独应用 RNAi 技术或单一传统防治方法的缺陷。从而也达到延缓害虫对 RNAi 产品的抗性发展、减少常规化学农药的使用剂量,并结合现有生物防治的方法以最终实现绿色可持续的害虫综合治理目标。所以在后续的研究中建立 RNAi 与传统害虫防治方法的联合应用方法与技术,对于促进昆虫 RNAi 研究从实验室走向田间具有重要的价值。

利用 RNAi 对害虫进行控制首先要达到高效率的基因沉默,然而当前的研究显示 RNAi 效率在不同昆虫中差异性很大,许多农业生产中的重大害虫如鳞翅目和半翅目类昆虫 RNAi 效率较低,但我们对这些昆虫 RNAi 作用的详细机制还不清楚,这直接影响了 RNAi 技术在这些重要昆虫中的有效应用。因此阐明重大害虫 RNAi 作用机制,包括主要害虫体内降解 dsRNA 的核酸酶、dsRNA 进入细胞的方式以及在昆虫体内传递 RNAi 信号的途径等,找到影响不同种类或类群昆虫 RNAi 效率的关键因子,进而发展出改善

相关昆虫基因沉默效率的有效方法,必将有助于促进 RNAi 技术在害虫防治领域的长效发展,对于减少化学农药的使用量和保障我国粮食作物的安全生产具有重要意义。

参考文献 (References)

- Bai H, Zhu F, Shah K, Palli SR, 2011. Large-scale RNAi screen of G protein-coupled receptors involved in larval growth, molting and metamorphosis in the red flour beetle. *BMC Genomics*, 12: 388.
- 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. *Nature Biotechnology*, 25(11): 1322–1326.
- Cappelle K, de Oliveira CF, Van Eynde B, Christiaens O, Smagghe G, 2016. The involvement of clathrin-mediated endocytosis and two Sid-1-like transmembrane proteins in double-stranded RNA uptake in the Colorado potato beetle midgut. *Insect Molecular Biology*, 25(3): 315–323.
- Chan SY, Snow JW, 2016. Uptake and impact of natural diet-derived small RNA in invertebrates: Implications for ecology and agriculture. *RNA Biology*, 14(4): 402–414.
- Chen C, Pan J, Di Y, Liu W, Hou L, Wang J, Zhao X, 2017. Protein kinase C delta phosphorylates ecdysone receptor B1 to promote gene expression and apoptosis under 20-hydroxyecdysone regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(34): 7121–7130.
- 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. *Bulletin of Entomological Research*, 98(6): 613–619.
- Dönitz J, Schmitt-Engel C, Grossmann D, Gerischer L, Tech M, Schoppmeier M, Klingler M, Bucher G, 2015. iBeetle-Base: a database for RNAi phenotypes in the red flour beetle *Tribolium castaneum*. *Nucleic Acids Research*, 43(D1): 720–725.
- Deng H, Zhang J, Li Y, Zheng S, Liu L, Huang L, Xu WH, Palli SR, Feng Q, 2012. Homeodomain POU and Abd-A proteins regulate the transcription of pupal genes during metamorphosis of the silkworm, *Bombyx mori*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(31): 12598–12603.
- Dubelman S, Fischer J, Zapata F, Huizinga K, Jiang C, Uffman J, Levine S, Carson D, 2014. Environmental fate of double-stranded RNA in agricultural soils. *PLoS ONE*, 9(3): e93155.
- Feinberg EH, Hunter CP, 2003. Transport of dsRNA into cells by the transmembrane protein SID-1. *Science*, 301(5639): 1545–1547.
- 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.
- Garber K, 2018. Alnylam launches era of RNAi drugs. *Nature Biotechnology*, 36(9): 777–778.
- Garbutt JS, Bellés X, Richards EH, Reynolds SE, 2013. Persistence of double-stranded RNA in insect hemolymph as a potential determiner of RNA interference success: evidence from *Manduca sexta* and *Blattella germanica*. *Journal of Insect Physiology*, 59(2): 171–178.
- Guan R, Hu S, Li H, Shi Z, Miao X, 2018a. The *in vivo* dsRNA cleavage has sequence preference in insects. *Frontiers in Physiology*, 9: 1768.
- Guan R, Li H, Fan Y, Hu S, Christiaens O, Smagghe G, Miao X, 2018b. A nuclease specific to lepidopteran insects suppresses RNAi. *The Journal of Biological Chemistry*, 293(16): 6011–6021.
- Guan R, Li H, Miao X, 2017. RNAi pest control and enhanced BT insecticidal efficiency achieved by dsRNA of chymotrypsin-like genes in *Ostrinia furnacalis*. *Journal of Pest Science*, 90(2): 745–757.
- Guo Z, Kang S, Zhu X, Xia J, Wu Q, Wang S, Xie W, Zhang Y, 2015. The novel ABC transporter ABCH1 is a potential target for RNAi-based insect pest control and resistance management. *Scientific Reports*, 5(1): 13728.
- Hassan A, Timerman Y, Hamdan R, Sela N, Avetisyan A, Halachmi N, Salzberg A, 2018. An RNAi screen identifies new genes required for normal morphogenesis of larval chordotonal organs. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 8(6): 1871–1884.
- He B, Chu Y, Yin M, Müllen K, An C, Shen J, 2013. Fluorescent nanoparticle delivered dsRNA toward genetic control of insect pests. *Advanced Materials*, 25(33): 4580–4584.
- Head GP, Carroll MW, Evans SP, Rule DM, Willse AR, Clark TL, Storer NP, Flannagan RD, Samuel LW, Meinke LJ, 2017. Evaluation of SmartStax and SmartStax PRO maize against western corn rootworm and northern corn rootworm: efficacy and resistance management. *Pest Management Science*, 73(9): 1883–1899.
- Ivashuta S, Zhang Y, Wiggins BE, Ramaseshadri P, Segers GC, Johnson S, Meyer SE, Kerstetter RA, McNulty BC, Bolognesi R, Heck GR, 2015. Environmental RNAi in herbivorous insects. *RNA*, 21(5): 840–850.
- Jose AM, Smith JJ, Hunter CP, 2009. Export of RNA silencing from *C. elegans* tissues does not require the RNA channel SID-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(7): 2283–2288.
- Khajuria C, Ivashuta S, Wiggins E, Flagel L, Moar W, Pleau M, Miller K, Zhang Y, Ramaseshadri P, Jiang C, Hodge T, Jensen P, Chen M, Gowda A, McNulty B, Vazquez C, Bolognesi R, Haas J, Head G, Clark T, 2018. Development and characterization of the first dsRNA-resistant insect population from western corn rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte. *PLoS ONE*, 13(5): e0197059.
- Knorr E, Bingsohn L, Kanost MR, Vilcinskas A, 2013. *Tribolium castaneum* as a model for high-throughput RNAi screening// Vilcinskas A (ed.). *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology//Yellow Biotechnology II*. Vol. 136. Berlin, Heidelberg: Springer. 163–178.
- Li F, Zhao X, Li M, He K, Huang C, Zhou Y, Li Z, Walters JR, 2019. Insect genomes: progress and challenges. *Insect Molecular Biology*, doi: 10.1111/imb.12599.

- Li T, Chen J, Fan X, Chen W, Zhang W, 2017. MicroRNA and dsRNA targeting chitin synthase A reveal a great potential for pest management of the hemipteran insect *Nilaparvata lugens*. *Pest Management Science*, 73(7): 1529–1537.
- Liu S, Li K, Gao Y, Liu X, Chen W, Ge W, Feng Q, Palli SR, Li S, 2018. Antagonistic actions of juvenile hormone and 20-hydroxyecdysone within the ring gland determine developmental transitions in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(1): 139–144.
- Liu Y, Ge Q, Chan B, Liu H, Singh S, Manley J, Lee J, Weideman A, Hou G, Hou SX, 2016. Whole-animal genome-wide RNAi screen identifies networks regulating male germline stem cells in *Drosophila*. *Nature Communications*, 7(1): 12149.
- Liu Z, Wang X, Dai Y, Wei X, Ni M, Zhang L, Zhu Z, 2019. Expressing double-stranded RNAs of insect hormone-related genes enhances baculovirus insecticidal activity. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(2): 419.
- Luo Y, Wang X, Yu D, Kang L, 2012. The SID-1 double-stranded RNA transporter is not required for systemic RNAi in the migratory locust. *RNA Biology*, 9(5): 663–671.
- Ma Z, Guo W, Guo X, Wang X, Kang L, 2011. Modulation of behavioral phase changes of the migratory locust by the catecholamine metabolic pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(10): 3882–3887.
- 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. *Nature Biotechnology*, 25(11): 1307–1313.
- Mitter N, Worrall EA, Robinson KE, Li P, Jain RG, Taochy C, Fletcher SJ, Carroll BJ, Lu GQ, Xu ZP, 2017. Clay nanosheets for topical delivery of RNAi for sustained protection against plant viruses. *Nature Plants*, 3: 16207.
- Mysore K, Hapairai LK, Sun L, Harper EI, Chen Y, Eggleston KK, Realey JS, Scheel ND, Severson DW, Wei N, Duman-Scheel M, 2017. Yeast interfering RNA larvicides targeting neural genes induce high rates of Anopheles larval mortality. *Malaria Journal*, 16(1): 461.
- Peng Y, Wang K, Fu W, Sheng C, Han Z, 2018. Biochemical comparison of dsRNA degrading nucleases in four different insects. *Frontiers in Physiology*, 9: 624.
- Petrick JS, Friedrich GE, Carleton SM, Kessenich CR, Silvanovich A, Zhang Y, Koch MS, 2016. Corn rootworm-active RNA DvSnf7: Repeat dose oral toxicology assessment in support of human and mammalian safety. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 81: 57–68.
- Ramaseshadri P, Segers G, Flannagan R, Wiggins E, Clinton W, Ilagan O, McNulty B, Clark T, Bolognesi R, 2013a. Physiological and cellular responses caused by RNAi-mediated suppression of Snf7 orthologue in western corn rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera*) larvae. *PLoS ONE*, 8(1): e54270.
- Ren D, Cai Z, Song J, Wu Z, Zhou S, 2014. dsRNA uptake and persistence account for tissue-dependent susceptibility to RNA interference in the migratory locust, *Locusta migratoria*. *Insect Molecular Biology*, 23(2): 175–184.
- Schmitt-Engel C, Schultheis D, Schwirz J, Ströhlein N, Troelenberg N, Majumdar U, Dao VA, Grossmann D, Richter T, Tech M, Dönitz J, Gerischer L, Theis M, Schild I, Trauner J, Koniszewski ND, Küster E, Kittelmann S, Hu Y, Lehmann S, Siemanowski J, Ulrich J, Panfilio KA, Schröder R, Morgenstern B, Stanke M, Buchholz F, Frasch M, Roth S, Wimmer EA, Schoppmeier M, Klingler M, Bucher G, 2015. The iBeetle large-scale RNAi screen reveals gene functions for insect development and physiology. *Nature Communications*, 6: 7822.
- Schultheis D, Weißkopf M, Schaub C, Ansari S, Dao V, Grossmann D, Majumdar U, Hakeemi M, Troelenberg N, Richter T, Schmitt-Engel C, Schwirz J, Ströhlein N, Teuscher M, Bucher G, Frasch M, 2019. A large scale systemic RNAi screen in the red flour beetle *Tribolium castaneum* identifies novel genes involved in insect muscle development. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 9(4): 1009–1026.
- Scott JG, Michel K, Bartholomay LC, Siegfried BD, Hunter WB, Smagghe G, Zhu KY, Douglas AE, 2013. Towards the elements of successful insect RNAi. *Journal of Insect Physiology*, 59(12): 1212–1221.
- Song H, Zhang J, Li D, Cooper A, Silver K, Li T, Liu X, Ma E, Zhu K, Zhang J, 2017. A double-stranded RNA degrading enzyme reduces the efficiency of oral RNA interference in migratory locust. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 86: 68–80.
- Spit J, Philips A, Wynant N, Santos D, Plaetinck G, Vanden Broeck J, 2017. Knockdown of nuclease activity in the gut enhances RNAi efficiency in the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*, but not in the desert locust, *Schistocerca gregaria*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 81: 103–116.
- Tan J, Levine SL, Bachman PM, Jensen PD, Mueller GM, Uffman JP, Meng C, Song Z, Richards KB, Beevers MH, 2016. No impact of DvSnf7 RNA on honey bee (*Apis mellifera* L.) adults and larvae in dietary feeding tests. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 35(2): 287–294.
- Terenius O, Papanicolaou A, Garbutt JS, Eleftherianos I, Huvenne H, Kanginakudru S, Albrechtsen M, An C, Aymeric J-LL, 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, Giebertowicz JM, Gómez I, Grimmelikhuijzen CJ, 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. *Journal of Insect Physiology*, 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.
- Ulrich J, Dao VA, Majumdar U, Schmitt-Engel C, Schwirz J, Schultheis D, Ströhlein N, Troelenberg N, Grossmann D, Richter T, Dönitz J, Gerischer L, Leboulle G, Vilcinskas A, Stanke M, Bucher G, 2015. Large scale RNAi screen in *Tribolium* reveals novel target genes for pest control and the proteasome as prime target. *BMC Genomics*, 16: 674.
- Vatanparast M, Kim Y, 2017. Optimization of recombinant bacteria expressing dsRNA to enhance insecticidal activity against a lepidopteran insect, *Spodoptera exigua*. *PLoS ONE*, 12(8): e0183054.
- Wang J, Wu M, Wang B, Han Z, 2013. Comparison of the RNA interference effects triggered by dsRNA and siRNA in *Tribolium castaneum*. *Pest Management Science*, 69(7): 781–786.
- Wang K, Peng Y, Pu J, Fu W, Wang J, Han Z, 2016. Variation in RNAi efficacy among insect species is attributable to dsRNA degradation *in vivo*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 77: 1–9.
- Wang X, Kang L, 2014. Molecular mechanisms of phase change in locusts. *Annual Review of Entomology*, 59(1): 225–244.
- Wei J, He YZ, Guo Q, Guo T, Liu YQ, Zhou XP, Liu SS, Wang XW, 2017. Vector development and vitellogenin determine the transovarial transmission of begomoviruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(26): 6746–6751.
- Wei JN, Shao WB, Cao MM, Ge J, Yang PC, Chen L, Wang XH, Kang L, 2019. Phenylacetone nitrile in locusts facilitates an antipredator defense by acting as an olfactory aposematic signal and cyanide precursor. *Science Advances*, 5(1): eaav5495.
- Whangbo JS, Weisman AS, Chae J, Hunter CP, 2017. SID-1 domains important for dsRNA import in *Caenorhabditis elegans*. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 7(12): 3887–3899.
- Whitten MM, Facey PD, Del Sol R, Fernández-Martínez LT, Evans MC, Mitchell JJ, Bodger OG, Dyson PJ, 2016. Symbiont-mediated RNA interference in insects. *Proceedings Biological Sciences*, 283(1825): 20160042.
- Winston WM, Sutherlin M, Wright AJ, Feinberg EH, Hunter CP, 2007. *Caenorhabditis elegans* SID-2 is required for environmental RNA interference. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(25): 10565–10570.
- Xu HJ, Xue J, Lu B, Zhang XC, Zhuo JC, He SF, Ma XF, Jiang YQ, Fan HW, Xu JY, Ye YX, Pan PL, Li Q, Bao YY, Nijhout H, Zhang CX, 2015. Two insulin receptors determine alternative wing morphs in planthoppers. *Nature*, 519(7544): 464–467.
- Xu H, Qian L, Wang X, Shao R, Hong Y, Liu S, Wang X, 2019. A salivary effector enables whitefly to feed on host plants by eliciting salicylic acid-signaling pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(2): 490–495.
- Yoon JS, Mogilicherla K, Gurusamy D, Chen X, Chereddy SCRR, Palli S, 2018. Double-stranded RNA binding protein, Staufen, is required for the initiation of RNAi in coleopteran insects. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(33): 201809381.
- Yu R, Xu X, Liang Y, Tian H, Pan Z, Jin S, Wang N, Zhang W, 2014. The insect ecdysone receptor is a good potential target for RNAi-based pest control. *International Journal of Biological Sciences*, 10(10): 1171–1180.
- Yu SJ, Pan Q, Luo R, Wang CL, Cheng LY, Yang JS, Zhou HN, Hou DY, Liu HQ, Ran C, 2019. Expression of exogenous dsRNA by *Lecanicillium attenuatum* enhances its virulence to *Dialeurodes citri*. *Pest Management Science*, 75(4): 1014–1023.
- Zhang CX, Pan PL, Xu HJ, Xue J, 2016. The molecular "switch" of rice planthoppers that develop into long or short wings. *Science & Technology Review*, 34(13): 60–66. [张传溪, 潘鹏路, 徐海君, 薛建, 2016. 稻飞虱发育为长翅或者短翅的分子“开关”. 科技导报, 34(13): 60–66.]
- Zhang J, Khan S, Heckel DG, Bock R, 2017a. Next-generation insect-resistant plants: RNAi-mediated crop protection. *Trends in Biotechnology*, 35(9): 871–882.
- Zhang J, Khan SA, Hasse C, Ruf S, Heckel DG, Bock R, 2015. Full crop protection from an insect pest by expression of long double-stranded RNAs in plastids. *Science*, 347(6225): 991–994.
- Zhang M, Zhou Y, Wang H, Jones H, Gao Q, Wang D, Ma Y, Xia L, 2013. Identifying potential RNAi targets in grain aphid (*Sitobion avenae* F.) based on transcriptome profiling of its alimentary canal after feeding on wheat plants. *BMC Genomics*, 14: 560.
- Zhang R, Wang B, Grossi G, Falabella P, Liu Y, Yan S, Lu J, Xi J, Wang G, 2017b. Molecular basis of alarm pheromone detection in aphids. *Current Biology*, 27(1): 55–61.
- Zheng Y, Hu Y, Yan S, Zhou H, Song D, Yin M, Shen J, 2019. A polymer/detergent formulation improves dsRNA penetration through the body wall and RNAi-induced mortality in the soybean aphid *Aphis glycines*. *Pest Management Science*, 75(7): 1993–1999.
- 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.
- Zhu J, Liu S, Ma Y, Zhang J, Qi HS, Wei Z, Yao Q, Zhang W, Li S, 2012. Improvement of pest resistance in transgenic tobacco plants expressing dsRNA of an insect-associated gene EcR. *PLoS ONE*, 7(6): e0038572.
- Zhu K, Merzendorfer H, Zhang W, Zhang J, Muthukrishnan S, 2016. Biosynthesis, turnover, and functions of chitin in insects. *Annual Review of Entomology*, 61(1): 177–196.
- Zotti M, Dos Santos EA, Cagliari D, Christiaens O, Taning CNT, Smaghe G, 2017. RNAi technology in crop protection against arthropod pests, pathogens and nematodes. *Pest Management Science*, 74(6): 1239–1250.