

RNAi 递送系统在害虫防治中的研究进展*

肖 蓓** 幸诗斯 邓 丹 彭 威*** 翟宗昭***

(动物肠道功能调控湖南省重点实验室, 淡水鱼类发育生物学国家重点实验室, 湖南省动物肠道生态与健康国际科技创新合作基地, 湖南师范大学, 长沙 410081)

摘 要 RNAi 是由 dsRNA 引发的, 靶向目的基因的高效与特异的基因沉默技术。由于其高效性、特异性和便捷性, RNAi 技术广泛应用于基因功能研究、高通量目的基因筛选、基因治疗、药物靶标预测和农业病虫害防治等领域。考虑到 RNAi 效率、安全性和预期靶基因下调的潜在障碍, RNAi 提供高效防治应用的前提是以合适的方式递送效应 RNA。本文对近期农业重要性害虫和病媒害虫防治应用中开发的 RNAi 递送系统进行综述, 对这些 RNAi 递送系统的干扰效率和多重进入位点作了比较, 并展望了 RNAi 递送系统在害虫防治中的应用, 以期更好地完善 RNAi 技术在昆虫学研究和害虫防治中的应用。

关键词 RNA 干扰; 喂食; 表皮渗透; 微生物; 纳米粒子; 害虫防治

Progress in research on the use of RNAi delivery systems in pest control

XIAO Bei** XING Shi-Si DENG Dan PENG Wei*** ZHAI Zong-Zhao***

(Hunan Provincial Key Laboratory of Animal Intestinal Function and Regulation, State Key Laboratory of Developmental Biology of Freshwater Fish, Hunan International Joint Laboratory of Animal Intestinal Ecology and Health, Hunan Normal University, Changsha 410081, China)

Abstract RNAi is triggered by dsRNA and causes an efficient and specific cleavage of the target gene. Because of its high efficiency, specificity and convenience, RNAi is widely used in gene function studies, high throughput screening of target genes, gene therapy, drug target prediction and agricultural pest control. RNAi can offer unprecedented levels of control, but an appropriate approach, giving due consideration to potential barriers to RNAi efficiency, safety and the intended purpose of the knockdown, is fundamental to its successful deployment. We review and compare the efficiency of recent innovations in RNAi delivery, including the different delivery systems used in agricultural pest and vector pest control. We discuss future applications of RNAi delivery systems in pest control in order to promote advances in entomological research based on better RNAi technologies.

Key words RNA interference; ingestion; cuticular penetration; microbes; nanoparticles; pest control

RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 是指由内源或外源双链 RNA (Double-stranded RNA, dsRNA) 引发的 mRNA 降解, 导致特异性阻碍靶标基因表达的现象。最早在秀丽隐杆线虫 *Caenorhabditis elegans* 中被发现, 通过导入 *par-1* 基因 dsRNA 沉默了靶标基因的表达 (Fire *et al.*,

1998)。由于 RNAi 诱导基因沉默具有高效性、特异性以及简便性的优点, RNAi 技术已广泛应用于害虫防治。病媒害虫不仅造成大量的农作物损失, 而且还是人类疾病的重要传播媒介, 如疟疾、登革热、锥虫病等 (Oerke, 2006)。使用传统化学杀虫剂存在多种问题, 包括对人体健康和

*资助项目 Supported projects: 浙江省自然科学基金项目(LQ21C140007); 联合国粮农组织和国际原子能署项目(D44003); 湖南省科技创新平台与人才计划 2018RS3067

**第一作者 First author, E-mail: beixiao323@163.com

***共同通讯作者 Co-corresponding authors, E-mail: weipeng@hunnu.edu.cn; zongzhao.zhai@foxmail.com

收稿日期 Received: 2020-09-03; 接受日期 Accepted: 2021-01-27

农业生态系统的影响以及对非靶标害虫的影响 (Lambrechts and Scott, 2009)。因此, 开发环境友好型的害虫防治产品成为目前当务之急, 而基于 RNAi 的害虫防治技术成为一种可能 (Price and Gatehouse, 2008)。

RNAi 通过干扰与害虫生长发育、抗性、免疫、产卵相关基因转录和翻译过程, 阻止蛋白质合成, 导致害虫环境适应能力降低或死亡。昆虫摄入靶标基因 dsRNA 在中肠位置被吸收, 若靶标基因并非位于中肠, 则沉默信号通过细胞或组织间传导, 到达靶基因部位进行 RNAi (Walski *et al.*, 2017)。因此, RNAi 效率最大化的关键是规避血淋巴尤其是肠道中核酸酶活性和肠道极端 pH 的能力。核酸酶活性和极端 pH 都会导致效应 RNA (双链 RNA (dsRNA)、短发夹 RNA (shRNA) 和短干扰 RNA (siRNA)) 的降解和失活 (Katoch and Thakur, 2012; Singh *et al.*, 2017; Peng *et al.*, 2018)。理想来说, 效应 RNA

应当完整到达靶细胞, 随之通过网格蛋白介导的内吞作用或者通过清道夫受体进入细胞, 在细胞质中被剪切成有活性的 siRNAs (Yoon *et al.*, 2017)。甚至更有可能的是, 一系列增殖或扩增导致 RNAi 出现系统性干扰效率 (Whangbo and Hunter, 2008)。从害虫控制角度看, 系统性 RNAi 更可能导致致死表型, 从而有利于害虫的治理和防治。

决定 RNAi 递送系统策略的两个因素是效应 RNA 的进入位点和效应 RNA 以何种形式行使功能。昆虫中效应 RNA 常见进入位点有肠道、呼吸系统、表皮和微生物体内合成。效应 RNA 进入途径分为口服进入 (包括直接进食人工合成的效应 RNA、转基因植物产生的效应 RNA、细菌诱导产生的效应 RNA 等)、表皮及表皮呼吸系统进入 (包括效应 RNA 的喷施、浸泡等) 及皮下注射 (图 1)。微生物体内合成效应 RNA 通常发生在肠腔中, 但也可在昆虫任意体腔中。效应

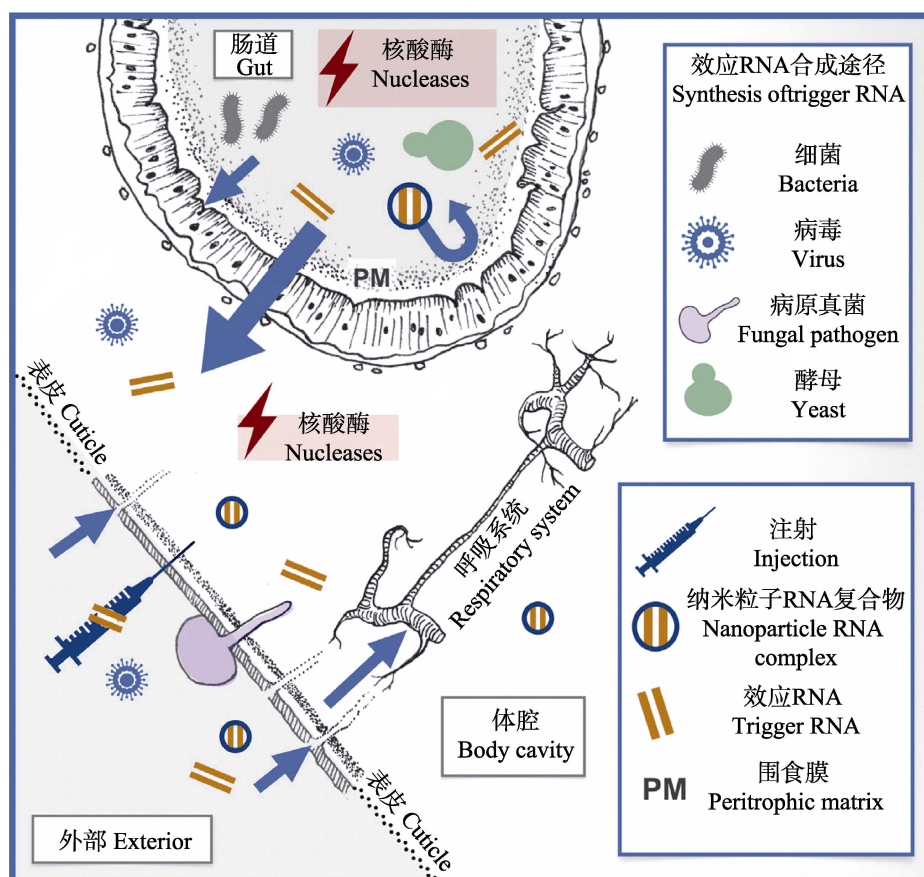


图 1 昆虫效应 RNA 递送系统 (Whitten, 2019)

Fig. 1 Delivery systems for trigger RNA in insects (Whitten, 2019)

RNA 不同的进入途径产生的 RNAi 效率差异显著。近年来,有关 RNAi 在昆虫基因功能研究和害虫防治中的应用综述主要集中于影响 RNAi 效率的因素、植物介导的害虫防治、dsRNA 的合成方法和 RNAi 在害虫防治中存在的问题及解决办法(刘吉升等, 2016; 沈修婧和杨广, 2016; 张涛等, 2018; 胡少茹等, 2019; 傅淑等, 2019; 马中正等, 2019)。本文对多种 RNAi 递送系统的多重进入位点作了介绍,并对这些 RNAi 递送系统干扰效率作了比较,重点阐述了昆虫肠道特性和纳米粒子介导的 RNAi 递送系统对 dsRNA 递送效率的影响,最后对 RNAi 递送系统在害虫综合防治中的应用进行了综述和展望。

1 RNAi 分子机制简介

RNAi 是一种进化保守的基因沉默技术,通过 siRNA 介导靶标 RNA 序列特异性降解,其在植物、动物和微生物中广泛发生,目前已广泛应用于昆虫基因功能和害虫防治的研究中(Carthew and Sontheimer, 2009; Tsai *et al.*, 2015; Zotti and Smagghe, 2015; 沈修婧和杨广, 2016; Zotti *et al.*, 2018; 胡少茹等, 2019; 傅淑等, 2019; Yan *et al.*, 2021)。RNAi 分为细胞自主型(Cell-autonomous)或非细胞自主型(Non cell-autonomous)两类,其中细胞自主型 RNAi 基因沉默发生在单细胞内,由细胞内产生的 dsRNA 或者导入细胞内的外源 dsRNA 所产生的基因沉默。非细胞自主型 RNAi 包括系统性 RNAi (Systemic RNAi) 和环境型 RNAi (Environmental RNAi),是指 dsRNA 触发的 RNAi 可以从起始位点传播至其他细胞或组织(Kunte *et al.*, 2019; Whitten, 2019; Yan *et al.*, 2021)。昆虫通过喂食 dsRNA 获得 RNAi 效应,要求其 dsRNA 在进入肠道的同时不能发生降解,继而 dsRNA 通过胞吞作用或者跨膜蛋白运输进入中肠细胞。中肠细胞内的 dsRNA 分子由相应运输机制穿过肠细胞并进入体腔,通过血淋巴运输至其它组织中实现系统性 RNAi (Kunte *et al.*, 2019)。细胞自主型 RNAi 发生过程如下:首先,dsRNA 被核酸内切酶 RNase III (Dicer 酶)

切割成 21-25 bp 长的 siRNA, siRNA 在胞内 RNA 解旋酶的作用下解链,其反义链被整合到 RNA 诱导沉默复合物(RNA-induced silencing complex, RISC)上,并特异性结合靶标基因信使 RNA (mRNA), RICS 在结合部位切割靶标基因 mRNA,导致 mRNA 降解(Zamore *et al.*, 2000; Preall and Sontheimer, 2005; Marques *et al.*, 2010)。非细胞自主型 RNAi 包括沉默信号从一个细胞向另外一个细胞传递的过程,这种 RNAi 只存在于多细胞生物中。非细胞自主型 RNAi 包括四个阶段:首先是 dsRNA 的喂食和输出,接着是沉默信号进入其它组织,最后是目的基因通过细胞自主型 RNAi 被沉默。由于非细胞自主型 RNAi 需要沉默信号传递到其它组织,因此需要一套沉默信号传递机制。其中包括跨膜蛋白通道喂食和胞吞作用喂食机制(Wynant *et al.*, 2014a; Cappelle *et al.*, 2016a)。不同物种介导产生 RNAi 所使用的效应 RNA 各不相同,昆虫等无脊椎动物通常使用 dsRNA 来实现 RNAi 效应。由于长链 dsRNA 会引发哺乳动物的免疫机制,激活宿主抗病毒反应(Saleh *et al.*, 2006; Bolognesi *et al.*, 2012)。因此,哺乳动物往往使用 siRNA、shRNA 和病毒载体表达 siRNA 获得 RNAi 效应。

2 喂食介导的 RNAi 递送系统

喂食介导的 RNAi 递送系统中效应 RNA 进入位点主要是肠道,中肠上皮细胞通过两种途径内化肠腔中的 dsRNA:跨膜通道蛋白介导的吸收途径和内吞途径,之后到达血淋巴(图 1)。通过喂食 dsRNA 导致靶标基因沉默的 RNAi 抗虫技术已有效防治多种农业重要性害虫(表 1)。其中靶标基因 *chitin synthase*、 *α -tubulin* 和 *Vacuolar-type H^+ -ATPase* 等对昆虫发育至关重要,抑制其表达可能导致昆虫死亡。目前,喂食介导的 RNAi 效应在不同昆虫间差异很大。dsRNA 在肠道中分解或被核酸酶降解可能是导致干扰效率不高一个原因。昆虫不同发育阶段也可能影响 RNAi 效率,如卵、幼虫和成虫阶段昆虫体内降解 dsRNA 的酶活和 pH 可能不同。对斑翅果蝇 *Drosophila suzukii* 成虫和幼虫饲喂

表 1 喂食介导的 RNAi 递送系统在基因功能研究中的应用

Table 1 The application of ingestion mediated RNAi delivery system in gene function study

昆虫 Insect	靶标基因 Targeted genes	效应 Effects	发育时期 Developmental stage	参考文献 References
西方玉米根虫 <i>Diabrotica virgifera</i>	<i>Vacuolar ATPase (subunits A, D, E)</i>	LC ₅₀ 为 1.82 ng/cm ²	幼虫	Baum <i>et al.</i> , 2007
	<i>α-tubulin</i>	LC ₅₀ 为 5.2 ng/cm ²		
	<i>V-ATPase subunit C</i>	LC ₅₀ 为 9.0 和 9.8 ng/cm ²	幼虫和成虫	Li <i>et al.</i> , 2018
南方玉米根虫 <i>Diabrotica undecimpunctata howardii</i>	<i>Vacuolar ATPase (subunits A, E), β-tubulin</i>	死亡率增加了 40%-50%	幼虫	Baum <i>et al.</i> , 2007
马铃薯甲虫 <i>Leptinotarsa decemlineata</i>	<i>Vacuolar ATPase (subunits A, E)</i>	死亡率高达 100%	幼虫	Baum <i>et al.</i> , 2007
豌豆长管蚜 <i>Acyrtosiphon pisum</i>	<i>inhibitor of apoptosis (IAP)</i>	死亡率高达 65%	幼虫和成虫	Cao <i>et al.</i> , 2018
	<i>Symbiosis-related genes amiD, ldcA1</i>	死亡率为 9%	幼虫	Mao and Zeng, 2012
	<i>ATPase subunit E</i>	没有出现死亡	幼虫	Chung <i>et al.</i> , 2018
斜纹夜蛾 <i>Spodoptera litura</i>	<i>Aminopeptidase N</i>	转录水平没有下调	幼虫	Rajagopal <i>et al.</i> , 2002
棉铃虫 <i>Helicoverpa armigera</i>	<i>Acetylcholinesterase gene (AChE)</i>	死亡率增加 60%，生长抑制增加 81%	4 龄幼虫	Kumar <i>et al.</i> , 2009
烟粉虱 <i>Bemisia tabaci</i>	<i>Actin ortholog</i>	死亡率为 18%	成虫	Shim <i>et al.</i> , 2015; Upadhyay <i>et al.</i> , 2016; Yang <i>et al.</i> , 2016, 2017; Grover <i>et al.</i> , 2019
	<i>ADT/ATP translocase</i>	死亡率为 15%		
	<i>α-tubulin Ribosomal protein</i>	死亡率为 34%		
	<i>Vacuolar-ATPase subunit A</i>	死亡率为 37%		
	<i>P450CYP6CM1</i>	死亡率为 70%		
	<i>P450CYP6CM1</i>	B 型烟粉虱成虫死亡率为 86%		
	<i>Glutathione S-transferase</i>	Q 型烟粉虱成虫死亡率为 586%		
	<i>Heat shock protein 70 (hsp70)</i>	死亡率高达 77%		
	<i>Vitellogenin receptor</i>	死亡率高达 80%		
	<i>Glutathione S-transferase</i>	死亡率高达 63%		
	<i>Hydroxyacidoxacid Transhydrogenase</i>	结合噻虫嗪死亡率高达 100%		
	<i>Acetylcholine receptor subunit α</i>	死亡率为 20%		
	<i>Alpha glucosidase 1</i>	死亡率为 45%		
	<i>Aquaporin 1</i>	死亡率为 84%		
	<i>Heat shock protein 70</i>	死亡率为 92%		
	<i>Trehalase 1 Trehalose transporter 1</i>	死亡率为 35%		
	<i>Toll-like receptor</i>	死亡率为 70%，LC ₅₀ 降低了 71%		

续表 1 (Table 1 continued)

昆虫 Insect	靶标基因 Targeted genes	效应 Effects	发育时期 Developmental stage	参考文献 References
台湾乳白蚁 <i>Coptotermes formosanus</i>	Conserved region of five endoglucanase genes: <i>CfEG1a</i> , <i>CfEG1b</i> , <i>CfEG2</i> , <i>CfEG3</i> , <i>CfEG4</i> (EG: endoglucanase)	死亡率高达 27%	成虫	Wu <i>et al.</i> , 2019
西方盲走螨 <i>Metaseiulus occidentalis</i>	<i>Transformer-2</i> <i>RpL11</i> , <i>RpS2</i> , <i>RpL8</i> , (Ribosomal Protein) <i>Pros26.4</i> <i>Clathrin heavy-chain gene</i> <i>BTB</i> (<i>Bric-à-brac</i> , <i>tramtrack</i> , and <i>Broad Complex</i>) genes	沉默效率为 70% 沉默效率高达 89% 沉默效率为 90% 沉默效率高达 95%	成虫	Niu <i>et al.</i> , 2018
亚洲玉米螟 <i>Ostrinia furnacalis</i>	<i>Glutathione S-transferase</i>	3 龄幼虫死亡率为 54%	3 龄幼虫	Zhang <i>et al.</i> , 2018a
柑橘木虱 <i>Diaphorina citri</i>	<i>Sucrose hydrolase</i> <i>Glutathione S-transferase</i>	死亡率高达 75% 噻虫嗪和甲氰菊酯处理死亡率提高了 45%	若虫 成虫	Santos-Ortega and Killiny, 2018 Yu and Killiny, 2018
东方粘虫 <i>Mythimna separata</i>	α -tubulin, β -tubulin	死亡率为 40%	4 龄幼虫	Wang <i>et al.</i> , 2018b
昆士兰实蝇 <i>Bactrocera tryoni</i>	<i>Spermatogenesis genes tssk1</i> , <i>topi</i> , <i>trxt</i>	后代数量减少了 78%	成虫	Cruz <i>et al.</i> , 2018
赤拟谷盗 <i>Tribolium castaneum</i>	<i>ATPase subunit E</i> , <i>Inhibitor of apoptosis (IAP)</i>	死亡率高达 100%	幼虫	Cao <i>et al.</i> , 2018
小菜蛾 <i>Plutella xylostella</i>	<i>Tyrosine hydroxylase</i>	死亡率高达 90%	幼虫	Ellango <i>et al.</i> , 2018
茶翅蛾 <i>Halyomorpha halys</i>	<i>IAP</i> , <i>Multivesicular body protein SNF7</i> , <i>PPI</i> <i>G Protein Coupled Receptor</i> <i>ATPase</i>	死亡率为 70% 死亡率为 50% 死亡率为 10%	2 龄若虫	Mogilicherla <i>et al.</i> , 2018
棉叶蝉 <i>Amrasca biguttula</i>	<i>Snf7</i> <i>AQP</i> <i>VATPase</i> <i>IAP</i>	死亡率为 48% 死亡率为 27.3% 死亡率为 20% 死亡率为 16.7%	若虫	Singh <i>et al.</i> , 2018

Vacuolar-sorting protein SNF7、*Vacuolar H⁺* *ATPase 26 kD E subunit*、*Ribosomal protein S13* 和 *alpha-coatomer* 基因 dsRNA, 成虫 RNAi 沉默效应和死亡率相较于幼虫低 (Taning *et al.*, 2016)。蚜虫 *Myzus persicae* 喂食 *voltage-gated sodium channels* 基因 dsRNA 后, 导致 1 龄和 2 龄幼虫比其它龄期幼虫 RNAi 效应更高 (Tariq *et al.*, 2019)。由于昆虫肠道环境和结构不同,

RNAi 干扰效率在鞘翅目高达 100%, 而在鳞翅目中则不到 50%。Shukla 等 (2016) 发现 dsRNA 在鳞翅目昆虫体内被降解的速率显著高于鞘翅目昆虫, Guan 等 (2018) 在亚洲玉米螟 *Ostrinia furnacalis* 中发现一个仅在几种鳞翅目昆虫特异表达的高效降解 dsRNA 的核酸酶基因 REase, 这可能是导致鳞翅目害虫 RNAi 效率较低的原因。对鞘翅目赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* 和半

翅目豌豆长管蚜 *Acyrtosiphon pisum* 喂食相同长度 *V-type ATPase subunit E* (*VTE*) 和 *inhibitor of apoptosis* (*IAP*) 基因 dsRNA 后, 赤拟谷盗死亡率为 100%, 而豌豆长管蚜死亡率为达到 65% (Cao *et al.*, 2018)。豌豆长管蚜属于刺吸式口器昆虫, 其由于缺少围食膜, 导致 RNAi 效率不高。另外, 喂食昆虫全长 dsRNA 效应分子比 siRNA 效应分子能启动更强的 RNAi 效应。如对美洲棉铃虫 *Helicoverpa zea* 和烟蚜夜蛾 *Heliothis virescens* 饲喂全长 *pheromone biosynthesis activating neuropeptide* (*PBAN*) 基因 dsRNA 后, 导致 2 种害虫幼虫生长延迟且死亡率为 75% 以上。而喂食 *PBAN* 基因 siRNA 后, 两种害虫的死亡率约为 55% (Choi and VanderMeer, 2019)。近几年来, 科研工作者已在多种病媒害虫中通过喂食靶标基因 dsRNA 介导产生 RNAi 效应。人疥螨 *Sarcoptes scabiei* 和屋尘螨 *Dermatophagoides pteronyssinus* 喂食 dsRNA 数小时后靶标基因表达量出现显著下调, 并在肠道中观察到荧光标记的 dsRNA (Marr *et al.*, 2015; Fernando *et al.*, 2017)。猫栉首蚤 *Ctenocephalides felis* 是重要的病媒昆虫, 其宿主分布广, 是多种疾病的直接或间接媒介。猫栉首蚤是蚤目中第一个被证实存在 RNAi 现象, 通过比较显微注射、喂食和浸泡 3 种递送 dsRNA 方式发现, 血液介导的喂食能够导致 *sigma* 家族 GST 抗氧化基因敲除效率高达 96% (Edwards *et al.*, 2018)。虽然每种递送方式导入昆虫体内 dsRNA 剂量无法类比, 但通过显微注入的剂量最小, 每头昆虫 dsRNA 注射量为 69 ng (Edwards *et al.*, 2018)。另外, 猫栉首蚤不存在肠道核酸酶降解 dsRNA 的情况。人疥螨、屋尘螨和猫栉首蚤 RNAi 实验表明通过发展基于 dsRNA 的局部治疗可以用来对付螨虫和蚤类害虫的侵袭。

通过喂食表达害虫重要靶标基因 dsRNA 的转基因植物可以介导害虫产生 RNAi 效应, 从而防治植食性害虫的为害。此方法已有效防治多种半翅目、鞘翅目和鳞翅目害虫。Zhang 等 (2015a) 利用马铃薯叶绿体表达科罗拉多马铃薯甲虫 *β-actin* 基因 dsRNA, 甲虫取食转基因马铃薯叶

片后导致幼虫死亡, 表明叶绿体表达靶标害虫 dsRNA 可以通过喂食成功介导 RNAi 效应。相似地, 在烟草叶绿体中表达 *acetylcholinesterase* 基因 dsRNA, 棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 幼虫取食后死亡率达到 70% (Zhang *et al.*, 2017)。通过核转化 (Nuclear transformation) 开发表达 dsRNA 的转基因植物也可以产生 RNAi 效应, 如核转化大豆表达 *18S ribosomal RNA* 基因 dsRNA 导致 35% 的大豆食心虫 *Leguminivora glycinivorella* 死亡, 且降低了对大豆的伤害 (Wang *et al.*, 2018a)。类似地, 核转化玉米表达 *Ras opposite* (*Rop*)、*DNA-directed RNA polymerase II subunit* (*RpIII140*)、*chromatin regulator* (*Dre4*) 和 *Pre-mRNA-splicing factor* (*nsm*) 基因 dsRNA 导致 60%-80% 的玉米根叶甲 *Diabrotica virgifera virgifera* 和油菜花露尾甲 *Meligethes aeneus* 死亡 (Knorr *et al.*, 2018)。对扶桑绵粉蚧 *Phenacoccus solenopsis* 喂食表皮鞣化激素基因 *Bursicon* 和腺苷三磷酸酶 *V-ATPase* 基因 dsRNA 的转基因烟草, 导致扶桑绵粉蚧死亡或者出现畸形表型 (Khan *et al.*, 2018)。Yoon 等 (2018) 构建了表达 *Methoprene-tolerant* 基因 dsRNA 的转基因烟草, 喂食叶片的二斑叶螨 *Tetranychus urticae* 幼虫死亡率在 35%-56% 之间。Deng 等 (2018) 对马铃薯甲虫幼虫喂食含有胰岛素受体 *chico* 基因 dsRNA 的马铃薯叶片后, 影响了氨基酸和糖类的吸收和代谢, 导致幼虫生长发育受阻。Sun 等 (2019) 在小麦中表达麦长管蚜 *Sitobion avenae* 消化吸收关键基因 *zinc finger protein* (*ZFP*) dsRNA, 麦长管蚜取食表达 *ZFP*-dsRNA 的小麦后, 导致其发育时间明显延长、蚜虫存活率及繁殖能力均显著降低, 且 RNAi 效应可有效传至下一代。喂食介导的 RNAi 递送系统的提出和应用已经过去相当长一段时间, 其 RNAi 效应受到肠道核酸酶、肠道 pH 和 dsRNA 效应分子长度的影响, 且喂食需要大量 dsRNA 激发 RNAi 效应。因此, 在大规模生产应用于农业重要性害虫和病媒害虫防治领域中可能仍然不具备成本效益。但是饲喂法 RNAi 体系高效和便利的特性使得其在

未来农业重要性害虫和病媒害虫防治领域中仍不可或缺,同时也可绿色环保的新型植物保护策略提供新靶标和新思路。

3 表皮渗透介导的 RNAi 递送系统

表皮渗透主要包括两种形式:注射和浸泡。表皮渗透介导的 RNAi 递送系统中效应 RNA 进入位点主要是表皮和气孔(图 1)。虽然注射能绕开肠道诱导系统反应,但大部分注射技术都比较费时且所需仪器要求比较高,因此注射法不适用于田间害虫的防治,但可用于实验室候选基因的筛选。通过注射介导的 dsRNA 递送系统已鉴定出多种可应用于农业重要性害虫防治的靶标基因。通过注射介导的 RNAi 干扰茄二十八星瓢虫 *Henosepilachna vigintioctopunctata* 翅形成作用基因 *vestigial* 和 *scalloped*, 导致成虫出现飞行缺陷表型 (Ohde *et al.*, 2009)。对甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* 注射血蓝蛋白超家族中两个与昆虫变态、生殖和发育过程中氨基酸来源相关的存储蛋白 *hexamerin1* 和 *hexamerin1* 基因 dsRNA, 导致其死亡率显著增高 (Tang *et al.*, 2010)。向牧草盲蝽 *Lygus lineolaris* 的成虫和若虫注射细胞凋亡抑制基因 *inhibitor of apoptosis* dsRNA, 发现成虫和若虫寿命显著缩短 (Walker and Allen, 2011)。在黄曲条跳甲 *Phyllotreta striolata* 末龄蛹期注射气味受体基因 *PsOr1* dsRNA 后, 成虫无法响应引诱剂或驱虫剂的刺激气味, 对寄主植物偏好选择出现障碍 (Zhao *et al.*, 2011)。昆虫表皮对其生长发育和生命活动起到重要的作用, 表皮蛋白是昆虫表皮的主要组成成分。Pan 等 (2018) 对褐飞虱 *Nilaparvata lugens* 注射表皮蛋白基因 dsRNA, 发现 32 种表皮蛋白基因被沉默后褐飞虱表现出胚胎发育不良、产卵量降低、若虫和成虫大量死亡, 为新型绿色农药设计和基于 RNAi 策略防治稻飞虱提供了明确的潜在靶标。稻飞虱是最具毁灭性的水稻害虫, 稻飞虱有两种翅的形式, 分别为长翅形态和短翅形态。Liu 等 (2020) 通过对褐飞虱、白背飞虱 *Sogatella furcifera* 和灰飞虱 *Laodelphax striatellus* 3 龄若虫注射 *Ubx* 基因 dsRNA, 证明

了 3 种稻飞虱的长/短翅转化可能受 *Ubx* 基因调控, 并作为响应宿主营养状况的长翅和短翅的关键调节器。对病媒害虫注射繁殖相关基因 dsRNA 的害虫防治策略近年来已开始得到应用。干扰温带臭虫 *Cimex lectularius* 雌成虫卵黄蛋白原 *vitellogenin* 基因表达, 显著降低雌虫产卵量, 卵巢出现萎缩, 脂肪体过度增大导致腹部肿胀 (Moriyama *et al.*, 2016)。对锥虫病媒介长红锥蝽 *Rhodnius prolixus* 雌成虫注射 *RpATG6* 基因 dsRNA, 破坏卵黄蛋白的产生, 导致卵黄蛋白在血淋巴中堆积, 卵母细胞停止发育 (Vieira *et al.*, 2018)。敲除家蝇 *Musca domestica* 雌成虫核糖蛋白 *ribosomal protein S6* 基因, 导致雌虫繁殖力显著下降 (Vieira *et al.*, 2018)。在以上几种病媒害虫 RNAi 干扰实验中, dsRNA 注射量从 5 μ g 到 20 ng 不等, 温带臭虫每毫克体重 dsRNA 注射量大约为 2.7 ng, 家蝇每毫克体重 dsRNA 注射量大约为 238 ng。

相对于注射, 通过浸泡介导的 dsRNA 递送系统节省劳力且能够应用于基因高通量筛选, 已有效防治多种农业重要性害虫和病媒害虫。将黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 幼虫浸泡于含有 β -glucuronidase 基因 dsRNA 和食用色素的混合溶液中, 导致葡萄糖醛酸糖苷酶的活性降低 50%, 且在肠道中检测到食用色素 (Whyard *et al.*, 2009)。Wang 等 (2011) 向亚洲玉米螟幼虫喷涂糜蛋白酶样丝氨酸蛋白酶 C3 dsRNA, 导致 40%-50% 的幼虫死亡, 荧光标记结果确认 dsRNA 能够渗透表皮并在体腔内传导。用 5 个 *cytochrome P450* 基因 dsRNA 溶液处理柑橘木虱 *Diaphorina citri* 成虫胸部, 导致成虫的死亡率显著高于对照处理 (Killiny *et al.*, 2014; Yu *et al.*, 2017)。另外, 通过浸泡介导的 dsRNA 递送系统靶标昆虫性别决定途径基因已应用于害虫不育防治技术, 如将埃及伊蚊 *Aedes aegypti* 幼虫浸泡在 dsRNA 混合物中, 干扰 *doublesex* 基因雌性亚型后, 97% 的后代为雄性表型, 3% 为不育雌性且丧失吸血冲动 (Whyard *et al.*, 2015)。将埃及伊蚊幼虫浸泡在 *transformer-2* 基因 dsRNA 中, 导致后代存活率约为 50%, 97.6% 的后代为雄性

(Hoang *et al.*, 2016)。通过浸泡介导的 dsRNA 递送系统已在长角血蜱 *Haemaphysalis longicornis* 幼虫、若虫和成虫发育阶段获得系统性 RNAi 效应。将长角血蜱雌虫浸泡在 *Hlf1* dsRNA 水溶液 12 h 后, 导致其吸血量和产卵量显著降低, 死亡率显著升高 (Galay *et al.*, 2016)。Zhang 等 (2018b) 结合荧光标记的 dsRNA 和脂质体转染试剂研究了镰形扇头蜱 *Rhipicephalus haemaphysaloides* dsRNA 吸收机制。荧光成像结果表明 dsRNA 通过浸泡从口和表皮的孔、管道进入镰形扇头蜱体内, 将不同发育阶段镰形扇头蜱浸泡在 *P0* 基因 dsRNA 和脂质体 RNA 复合体混合液中 17 h, 能够高效敲除 *P0* 基因表达, 影响其吸血、蜕皮和繁殖生理过程的正常进行。其决定镰形扇头蜱 RNAi 效率的最重要因素是浸泡时间的长短, 超过 dsRNA 浓度或脂质体类型对 RNAi 效率的影响。

4 微生物介导的 RNAi 递送系统

微生物介导的 RNAi 递送系统中效应 RNA 进入位点是肠道和体内合成 (图 1)。相较于体外合成 dsRNA 和植物调控表达 dsRNA 的递送系统, 利用微生物递送 dsRNA 具有诸多优势。通过微生物表达 dsRNA 价格便宜, 因而可以大规模应用于生物农药的制备, 并且还能减少害虫抗药性的产生。

4.1 细菌

利用重组共生菌表达 dsRNA 介导产生 RNAi 效应首先应用于鳞翅目, Tian 等 (2009) 等人利用重组大肠杆菌 *Escherichia coli* 表达甜菜夜蛾几丁质酶基因的 dsRNA, 幼虫喂食表达 dsRNA 的菌液成功实现目标基因干扰, 导致幼虫死亡率显著上升, 且幼虫形态出现畸形。此研究表明重组共生细菌能在昆虫肠道释放靶标基因 dsRNA, 进而通过 Sil 蛋白介导的途径被肠道上皮细胞吸收。在长红锥蝽若虫和成虫喂食表达抗氧化功能基因 *heme-binding protein (RHBP)* 和 *catalase (CAT)* dsRNA 大肠杆菌菌液, 引起 *RHBP* 和 *CAT* 基因系统性 RNAi 效应, 导致若虫蜕皮

和成虫产卵行为受阻, 死亡率显著提升。对长红锥蝽雌成虫喂食表达 *RHBP* 基因特异短发夹 RNA (Short hairpin RNA, shRNA) 的共生菌棒状红球菌 *Rhodococcus rhodnii*, 导致 *RHBP* 基因表达量和产卵量显著降低 (Taracena *et al.*, 2015)。Whitten 等 (2016) 在西花蓟马 *Frankliniella occidentalis* 和长红锥蝽构建棒状红球菌 RNase III 缺陷型 dsRNA 表达共生菌系统, 喂食表达靶标 *vitellogenin* 和 *alpha-tubulin* 基因 dsRNA 后导致相应表型缺失, 死亡率为 60%-70%, 并且这种系统性敲除表型能够水平传播。细菌介导 RNAi 效应不仅可以利用活体细菌表达 dsRNA 来完成, 而且通过热灭活细菌表达 dsRNA 也能够介导产生。但是两者产生的 RNAi 效率有差异, 活体细菌比热灭活细菌更有能力保护 dsRNA 不被肠道核酸酶和 pH 降解。东方黏虫 *Mythimna separata* 幼虫喂食表达 *Chitinase* 基因的热灭活转基因大肠杆菌 5 d 后, 其死亡率约 16% (Ganbaatar *et al.*, 2017)。而东方黏虫取食含有表达 2 个 *tubulin* 基因 dsRNA 的活体大肠杆菌 5 d 后, 导致幼虫蜕皮受到抑制且 40% 幼虫死亡 (Wang *et al.*, 2018b)。小菜蛾和棉铃虫幼虫喂食表达 dsRNA 的活体细菌会严重影响幼虫的蜕皮且死亡率高达 50%, 而成虫喂食则显著抑制雌虫产卵和卵的孵化率 (Israni and Rajam, 2017)。共生菌介导的递送系统理论上具有双重特异性, 其一是 dsRNA 序列特异性, 其二是寄主和共生菌协同进化特异性。肠道共生菌能够持续生产靶向寄主特异基因 dsRNA, 从而诱导 RNAi 效应。因此, 共生菌调控的 RNAi 效应通过种群水平传播或者垂直传播途径可以实现害虫种群的防治。在未来的研究中, 有必要鉴定和分离合适的共生细菌以降低排斥反应。另外, 由于昆虫后肠 dsRNA 酶含量相对较低 (Katoch and Thakur, 2012), 鉴定和分离定殖于后肠的共生细菌有利于 RNAi 效应的产生。

4.2 病毒

利用病毒可以高效特异递送 dsRNA 至靶标部位产生 RNAi 效应 (Kolliopoulou *et al.*, 2017)。

由于构建木本植物如柑橘、葡萄、苹果转基因品系表达 dsRNA 难度巨大,因而通过对这些植物的病毒重组改造表达 dsRNA 成为一种切实可行且高效的植物保护防治策略。病毒感染植物后通过韧皮部在组织中系统运输,害虫取食韧皮部后能够诱导其产生 RNAi 效应。Wuriyangan 和 Falk (2013) 对烟草花叶病毒 Tobacco mosaic virus (TMV) 进行遗传改造,构建了表达番茄木虱 *actin* 和 *V-ATPase* 基因 dsRNA 重组病毒载体,番茄木虱取食感染 TMV 番茄后,其基因表达量和后代数量显著下降。Khan 等 (2013) 在烟草中构建了表达柑橘粉蚧 *Planococcus citri actin*、*chitin synthase 1* 和 *V-ATPase* 基因 dsRNA 重组 TMV 载体,柑橘粉蚧取食感染 TMV 烟草导致繁殖力显著降低。昆虫拥有众多种属特异病毒如杆状病毒、细小病毒、小核糖核酸病毒等,对这些病毒进行遗传改造表达序列特异 dsRNA,可以介导产生 RNAi 效应。Gu 等 (2011) 首次在白纹伊蚊 *Aedes albopictus* 成功建立重组浓核病毒 densovirus (DNV) shRNA 表达系统,白纹伊蚊幼虫感染表达 *V-ATPase* 基因 shRNA 的浓核病毒能下调 70% 该基因表达量,导致致病率显著升高。Taning 等 (2018) 在黑腹果蝇中构建了羊舍病毒 Flock House virus (FHV) siRNA 递送系统,在体内和体外实验中,所有靶标基因表达量显著下调,致死率显著上升。由于 FHV 具有多寄主特性,能够侵染多种昆虫,因此 Taning 等 (2018) 开发的 FHV 介导的 siRNA 递送系统可以作为基因功能研究工具,广泛应用于 dsRNA 喂食受限的农业害虫和病媒害虫中,提高 RNAi 效率。另外,病毒侵染本身也能提高害虫 RNAi 效率。Cappelle 等 (2016b) 发现欧洲熊蜂 *Bombus terrestris* 感染以色列急性麻痹病毒 Israeli acute paralysis virus (IAPV) 后 RNAi 系统工作效率升高。类病毒颗粒 (Virus-like particles, VLPs) 具有和病毒相同的结构组件,通过蛋白质壳体包裹效应 RNA (dsRNA、siRNA 和 shRNA) 完成自发组装,在未来害虫防治应用中具有重大的潜力。

4.3 酵母

通过酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 发

酵生产大量效应 RNA 可以应用于微生物介导的 RNAi 递送系统。Murphy 等 (2016) 对斑翅果蝇饲喂经过遗传改造的表达 *y-tubulin 23C* (*yTub23C*) 基因 dsRNA 的酿酒酵母,导致斑翅果蝇幼虫存活率、雌虫产卵量和运动能力出现显著下降。Mysore 等 (2017) 在冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae* 开发出一种由酵母表达特异 shRNA 的幼虫杀虫剂,通过酿酒酵母表达冈比亚按蚊幼虫发育必需基因 *suppressor of actin* (*Sac1*)、*leukocyte receptor complex member* (*lrc*) 和 *offtrack* (*otk*) 基因 shRNA,幼虫喂食经过编辑的酿酒酵母后 3 个靶标基因表达量显著下调,导致幼虫 100% 死亡。喂食死亡的酿酒酵母细胞同样也能导致幼虫死亡,表明由这种酵母表达的杀虫剂是防治幼虫阶段为水生的蚊虫的一种重要手段。将其制成干燥失活的 RNAi 药片非常适合偏远地区蚊虫高发地各种蚊虫的防治。

4.4 病原真菌

基于昆虫病原真菌玫烟色棒束孢 *Isaria fumosorosea* 构建 dsRNA 表达系统已在烟粉虱 *Bemisia tabaci* 中得到应用。重组玫烟色棒束孢通过表皮渗透侵染烟粉虱,敲除免疫基因 *TLR7*,导致若虫死亡率增加,玫烟色棒束孢致死中浓度降低,对烟粉虱毒性升高 (Chen *et al.*, 2015; Hu and Wu, 2016)。利用昆虫病原真菌介导 RNAi 来提高其自身毒性方法可以与其它害虫控制策略有效结合起来。由于玫烟色棒束孢缺乏宿主特异性,开发其它具有宿主特异性的病原真菌如 *Metarhizium brunneum* 介导的 RNAi 效应可以应用于防治病媒蚊虫 (Alkhaibari *et al.*, 2018)。

5 纳米粒子介导的 RNAi 递送系统

纳米粒子 (Nanoparticles, NPs) 是指大小为 1-500 nm 的粒子,包含阳离子聚合物、肽类、糖类、脂质和金属等不同分子。纳米粒子具有稳定性、生物降解性、可修饰性和对环境安全等特点,不仅能够降低昆虫消化系统中各种核酸酶和极端 pH 对 dsRNA 的降解,并且还能作为分子载体促进 dsRNA 跨膜转运,从而增加细胞对

dsRNA 的吸收量。纳米粒子介导的 RNAi 递送系统可以显著提高害虫 RNAi 效率, 由纳米粒子介导的效应 RNA 进入位点有肠道和呼吸系统 (图 1)。壳聚糖、脂质体、二氧化硅、全氟化碳、含胍聚合物、碳量子点 (Carbon quantum dot, CQD)、两亲性超支化聚合物 (Branched amphiphilic peptide capsules, BAPC) 和核壳纳米粒子等已经应用于昆虫 RNAi 效应 (表 2)。对冈比亚按蚊幼虫喂食壳聚糖包裹的 dsRNA 沉默几丁质合成酶基因 *CHS1* 和 *CHS2*, 导致几丁质含量降低, 幼虫对除虫脲和二硫苏糖醇敏感 (Zhang *et al.*, 2010)。在埃及伊蚊中利用壳聚糖、量子点和二氧化硅包裹 dsRNA 靶标 *SNF7* 和 *SRC* 基因, 发现 CQD 是 dsRNA 稳定存在最有效载体, 能够导致靶标基因的沉默和幼虫的死亡 (Das *et al.*, 2015)。在埃及伊蚊和冈比亚按蚊中, 壳聚糖包裹的 dsRNA 和 siRNA 效应分子导致幼虫靶标基因沉默, 干扰效果能够持续到蛹期 (Zhang *et al.*, 2015b; Ramesh Kumar *et al.*, 2016)。利用阳离子脂质体包裹的方法能有效降低德国小蠊 *Blattella germanica* 中肠对 dsRNA 的降解, 导致中肠特异表达 *tubulin* 基因的敲除, 进而导致幼虫死亡率增加 (Lin *et al.*, 2016)。然而需要注意的是, 脂质体介导的效应 RNA 递送系统不能穿过围食膜 (Peritrophic membrane, PM), 导致其应用受到一定限制。昆虫围食膜主要由甲壳素和糖蛋白组成, 其中带负电荷的蛋白多糖对 dsRNA 带负电荷的磷酸骨架产生排斥力, 阻碍 dsRNA 自由运输通过围食膜。利用阳离子聚合物纳米粒子屏蔽带负电的 dsRNA 可以增强 dsRNA 穿透围食膜的转运效率。He 等 (2013) 用含有阳离子核壳型荧光纳米颗粒包裹的 dsRNA 饲喂黑腹果蝇幼虫, 比单独裸露的 dsRNA 能更有效地穿过围食膜。利用气溶胶将全氟化碳包裹的 siRNA 纳米粒子从微气管导入豌豆蚜 *Acyrtosiphon pisum*、大豆蚜 *Aphis glycines* 和麦二叉蚜 *Schizaphis graminum* 内脏器官, 从而避开肠道和血淋巴, 导致靶标基因表达量下调并出现相应表型缺陷 (Thairu *et al.*, 2017)。因此, 气溶胶介导的 RNAi 杀灭有益昆虫蜜蜂体内的瓦螨 *Varroa* 将是未来研究的重要

方向。纳米粒子能显著提高对 RNAi 有耐受性昆虫的干扰效率, 特别是肠道环境为强碱性的甜菜夜蛾等许多鳞翅目昆虫。用聚合的鸟苷酸纳米粒子和 *chitin synthase B* 基因 dsRNA 合成物处理甜菜夜蛾可使其死亡率增加 53%, 而单独的 dsRNA 处理死亡率只有 16%。另外, 用甜菜夜蛾肠液处理 dsRNA/聚合物纳米粒子复合体, dsRNA 耐受肠液降解时间长达 30 h (Christiaens *et al.*, 2018)。在草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda* 开发的基于含胍阳离子聚甲基丙烯酸酯聚合物的纳米粒子能够保护 dsRNA 免受中肠核酸酶和极端 pH 的降解, 且能提高细胞对 dsRNA 的摄入量, 引起高效基因敲除现象 (Parsons *et al.*, 2018)。BAPC 纳米粒子含有氨基, 在碱性肠道环境中更稳定, 饲喂豌豆蚜 BAPC 纳米粒子和 *BiP* 基因 dsRNA 混合物导致豌豆蚜死亡时间显著提早 (Avila *et al.*, 2018)。需要注意的是, 一些阳离子纳米粒子可引起细胞膜不稳定, 触发细胞毒性。脂质体纳米粒子可启动免疫反应, 抑制重要酶如蛋白激酶的活性。因此纳米粒子在应用于农业重要性害虫和病媒害虫防治前应进行安全评估。总的来说, 纳米颗粒不仅能保护 dsRNA、shRNA 和 siRNA 免受核酸酶和极端 pH 降解, 还能增加细胞的摄入量产生更加高效 RNAi 效应。绝大多数纳米粒子还具有生物降解和生物相容性的特点, 因此是一种环境友好型的害虫防治措施。

6 展望

RNAi 因其靶标基因选择灵活、专一性强、对人畜无任何毒害、不易使昆虫产生抗性、对昆虫天敌和其它微生物无副作用等优点, 已作为基因功能研究工具广泛应用于农业重要性害虫和病媒昆虫的防治 (Kupferschmidt, 2013; Palli, 2014; Saurabh *et al.*, 2014; Nandety *et al.*, 2015; Sherman *et al.*, 2015; Zotti and Smagghe, 2015; Andrade and Hunter, 2016; Yan *et al.*, 2021)。RNAi 有效性主要依赖于效应 RNA 以何种方式递送至靶标部位、效应 RNA 的稳定性和目标害虫对效应 RNA 的吸收。目前喂食介导的 RNAi

表 2 纳米粒子调控的 RNAi 系统在基因功能研究中的应用

Table 2 The application of nanoparticles mediated RNAi delivery system in gene function study

昆虫 Insect	靶标基因 Targeted genes	纳米颗粒 Nanoparticle	递送方式 Delivery approach	效应 Effects	参考文献 References
赤拟谷盗 <i>Tribolium castaneum</i>	<i>BiP</i> , <i>Armet</i>	两亲性超支化聚合物 Branched amphiphilic peptide capsules	喂食	死亡率高达 75%	Avila <i>et al.</i> , 2018
豌豆长管蚜 <i>Acyrtosiphon pisum</i>	<i>BiP</i>	两亲性超支化聚合物 Branched amphiphilic peptide capsules	喂食	和裸露的 dsRNA 相比, 其全部死亡的时间减少一半	Avila <i>et al.</i> , 2018
冈比亚按蚊 <i>Anopheles gambiae</i>	<i>Chitin synthase 1</i>	壳聚糖 Chitosan	喂食	干扰效率为 62.8%, 几丁质含量减少了 33.8%	Zhang <i>et al.</i> , 2010
	<i>Chitin synthase 2</i>	壳聚糖 Chitosan	喂食	干扰效率为 40%-60%, 死亡率显著增加	Zhang <i>et al.</i> , 2015b
	<i>Cadherin1 and Cadherin2</i>	壳聚糖 Chitosan	喂食	干扰效率为 51%和 80%, Cry11Ba 毒性降低 50%和 42%	Zhang <i>et al.</i> , 2015c
亚洲玉米螟 <i>Ostrinia furnacalis</i>	<i>Chitinase CHT10</i>	阳离子核壳荧光纳米粒子 Cationic core-shell fluorescent nanoparticle	喂食	表型显著改变	He <i>et al.</i> , 2013
	<i>Chitinase-like gene, CHT10</i>	二亚胺阳离子聚合物 Perylenediimide-cored cationic dendrimers	注射和喂食	体重降低, 蜕皮出现缺陷并死亡	He <i>et al.</i> , 2013
	<i>Serpin-3</i>	二亚胺阳离子聚合物 Perylenediimide-cored cationic dendrimers	喂食	干扰效率为 51%	Shen <i>et al.</i> , 2014
二化螟 <i>Chilo suppressalis</i>	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene</i>	壳聚糖 Chitosan	喂食	干扰效率为 43%, 死亡率为 55%	Wang <i>et al.</i> , 2019
	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene</i>	脂质体 Liposomes	喂食	干扰效率为 31%, 死亡率为 32%	Wang <i>et al.</i> , 2019
	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene</i>	碳量子点 Carbon quantum dots	喂食	干扰效率为 57%, 死亡率为 70%	Wang <i>et al.</i> , 2019
埃及伊蚊 <i>Aedes aegypti</i>	<i>SNF7, SRC</i>	壳聚糖 Chitosan	喂食	死亡率高达 47%	Zhang <i>et al.</i> , 2015b;
		碳量子点 Carbon quantum dots	喂食	死亡率高达 75%	Das <i>et al.</i> , 2015
		胺/二氧化硅纳米粒子 Amine functionalized silica nanoparticle	喂食	没有出现死亡	
	<i>Sema1a, sim</i>	壳聚糖 Chitosan	喂食	干扰效率为 40%	Das <i>et al.</i> , 2015
	<i>DOPAL synthase</i>	壳聚糖 Chitosan	喂食	干扰效率为 80%	Chen <i>et al.</i> , 2019
	<i>Vestigial gene</i>	壳聚糖 Chitosan	喂食	干扰效率为 30%, 蛹期和成虫期延迟	Kumar <i>et al.</i> , 2016
	<i>IAP</i>	壳聚糖/多聚磷酸钠 Chitosan-sodium tripolyphosphate	喂食	干扰效率为 62%, 死亡率大于 60%	Dhandapani <i>et al.</i> , 2019

续表 2 (Table 2 continued)

昆虫 Insect	靶标基因 Targeted genes	纳米颗粒 Nanoparticle	递送方式 Delivery approach	效应 Effects	参考文献 References
甜菜夜蛾 <i>Spodoptera exigua</i>	<i>Chitin synthase B</i>	含胍聚合物 Guanidine-containing polymers	喂食	相较于裸露的 dsRNA 处理导致的 16% 的死亡率, 2018 纳米颗粒包裹导致的死亡率高达 53%	Christiaens <i>et al.</i> , 2018
草地贪夜蛾 <i>Spodoptera frugiperda</i>	<i>V-ATPase</i>	功能性胍聚合电解质复合物 Guanidinium-functionalized interpolyelectrolyte complexes	喂食	80% 个体成功干扰死亡率高达 40%	Parsons <i>et al.</i> , 2018
德国小蠊 <i>Blattella germanica</i>	<i>α-tubulin</i>	脂质体 Liposomes	喂食	死亡率在 24%-60% 之间	Huang <i>et al.</i> , 2018
美洲螬 <i>Euschistus heros</i>	<i>V-ATPaseA, Muscle actin</i>	脂质体 Liposomes	喂食	死亡率分别为 45% 和 42%	Castellanos <i>et al.</i> , 2019
黑腹果蝇 <i>Drosophila melanogaster</i>	<i>V-ATPaseE</i>	脂质体 Liposomes	浸泡和喂食	干扰效率为 56.2%, 死亡率为 65%	Whyard <i>et al.</i> , 2009
	<i>multiple genes involved in DDT resistance</i>	聚酰胺纳米颗粒 Polyamidoamine dendrimer nanoparticles	喂食	对 DDT 的敏感性提高	Kim <i>et al.</i> , 2018
斑翅果蝇 <i>Drosophila suzukii</i>	<i>Vacuolar H⁺-ATPase 26kD E subunit (Vha26)</i>	脂质体 Liposomes	喂食	干扰效率为 42%, 死亡率为 42%	Taning <i>et al.</i> , 2016
小地老虎 <i>Agrotis ypsilon</i>	<i>Wingless</i>	二亚胺阳离子聚合物 Perylenediimide-cored cationic dendrimers	喂食	干扰效率为 40%, 出现生长缺陷	Liu <i>et al.</i> , 2014
	<i>Decapentaplegic gene</i>	二亚胺阳离子聚合物 Perylenediimide-cored cationic dendrimers	喂食	身体大小降低 35%	Xu <i>et al.</i> , 2014
	<i>V-ATPase</i>	星状阳离子聚合物 polycation	Star 注射和喂食	干扰效率为 60%, 身体长度变短	Li <i>et al.</i> , 2019
橘小实蝇 <i>Bactrocera dorsalis</i>	<i>Epidermal growth factor receptor</i>	二亚胺阳离子聚合物 Perylenediimide-cored cationic dendrimers	喂食	干扰效率为 40%, 死亡率为 33.3%	Guo <i>et al.</i> , 2018
番石榴实蝇 <i>Bactrocera correcta</i>	<i>Epidermal growth factor receptor</i>	二亚胺阳离子聚合物 Perylenediimide-cored cationic dendrimers	喂食	干扰效率为 50%, 死亡率为 51.7%	Guo <i>et al.</i> , 2018
大豆蚜 <i>Aphis glycines</i>	<i>Hemocytin</i>	二亚胺阳离子聚合物 Perylenediimide-cored cationic dendrimers	外用	干扰效率为 95.4%, 种群密度抑制率为 80.5%	Zheng <i>et al.</i> , 2019
	<i>Soluble trehalase, V-ATPaseD, V-ATPaseE and chitin synthase I</i>	星状阳离子聚合物 polycation	Star 外用和喷洒	干扰效率为 86.86% 和 58.87%, 死亡率为 81.67% 和 78.5%	Yan <i>et al.</i> , 2020
	<i>Branched chain-amino acid transaminase</i>	全氟化碳纳米颗粒 Perfluorocarbon nanoparticles	喷洒	干扰效率为 30%, 体重降低	Thairu <i>et al.</i> , 2017
意蜂 <i>Apis mellifera</i>	<i>DNA methyl-transferase 3</i>	全氟化碳纳米颗粒 Perfluorocarbon nanoparticles	喷洒	全基因组甲基化水平降低, 导致四种不同类型的剪切事件	Li-Byarlay <i>et al.</i> , 2013

是将效应 RNA 导入害虫体内最普遍的方式, 该方式操作简单, 易于实现, 在防治多种农业重要性害虫和病媒昆虫中展现出优异的抗虫性能。喂食不需要专门的设备, 对 RNAi 开展研究较为便捷。但其缺点是作用效果慢, 卵和蛹期阶段的昆虫因无法取食导致其应用受到限制。沙漠飞蝗 RNAi 体内实验表明通过注射 dsRNA 介导的 RNAi 效应远高于喂食, 原因就在于喂食会导致部分 dsRNA 降解, 而注射的 dsRNA 会通过受体介导的内吞作用增强 RNAi 效果 (Wynant *et al.*, 2014a, 2014b)。因此, 在喂食介导的 RNAi 效应中靶标基因的选择就至关重要, 而害虫防治中 RNAi 主要靶标基因是中肠的酶和蛋白质, 如消化机制中的葡聚糖酶和丝氨酸蛋白酶、防御机制中的过氧化氢酶和代谢过程中的糖原合酶和几丁质酶, 干扰这些基因的表达能够导致害虫死亡。采用 RNAi 技术的抗虫转基因作物将特定序列的 dsRNA 转入植物体中, 通过害虫取食转基因作物的途径进入害虫体内引发 RNAi 机制, 实现精准抗虫且不伤及其它非靶标生物。通过酵母介导的效应 RNA 递送系统具有诸多优势。酵母生产和输送的效应 RNA 在环境中相对不易降解, 利用酵母进行生产容易且便宜, 而且酵母是一种无处不在、安全的微生物。基于纳米颗粒介导的 RNAi 递送系统能够保护效应 RNA 不受恶劣环境如核酸降解酶的影响, 使效应 RNA 持久释放作用于靶标部位, 已成功防治多种鳞翅目害虫。Yan 等 (2021) 构建了一种星形阳离子聚合物 (Star polycation, SPc) 作为 dsRNA 递送载体, 显著提高了 dsRNA 穿透害虫体壁的能力进而提升杀虫效率, 在害虫防治领域展现出广阔的应用前景。

尽管 CRISPR/Cas9 基因编辑技术因其精准性、简易性和高效性受到广大科研工作者的欢迎, 但是其潜在脱靶效应还有待进一步评估。目前 RNAi 仍然是昆虫学研究和害虫防治应用中的重要遗传策略。由于 dsRNA 具有高度特异性, 属于天然存在于环境或生物体内的物质, 不会影响非靶标生物且能通过天然途径降解。因此, RNAi 防治体系对人畜无毒性, 不改变人畜的基

因组, 不会破坏生态系统。RNAi 高度特异性不仅可以减少广谱杀虫剂产生的害虫抗药性现象, 而且对害虫的自然天敌具有保护作用。可以针对所有种类的害虫开发基于 RNAi 的生物农药, 提高害虫防治对象的覆盖面。利用 RNAi 技术防治害虫主要取决于 dsRNA 传递至靶标害虫的效率, dsRNA 是否能稳定存在于昆虫体内。因此, 选择合适的效应 RNA 递送方式是害虫防治应用中 RNAi 高效、安全的关键。利用细菌、病毒、纳米粒子介导的效应 RNA 递送系统能够提高 RNAi 效率, 选择何种递送方式应综合考虑环境、目标害虫和影响 RNAi 效率因素。比如, 纳米粒子介导的递送系统可以用于对 RNAi 耐受的细胞摄入效应 RNA 受限的害虫。当需要考虑效应 RNA 进入害虫体内后的稳定性, 就可以采用细菌和纳米粒子介导的递送系统。而考虑到细胞摄入、效应 RNA 降解和目标害虫难以触及时, 利用病毒调控的递送系统就成为理想的解决方案。原因在于感染病毒后害虫细胞能立即产生 dsRNA 诱导 RNAi 效应。利用转基因植物表达害虫特异靶标基因 dsRNA, 通过喂食介导的递送系统可以选择性的防治不同种类害虫。利用纳米颗粒介导的递送系统和利用众多微生物表达效应 RNA 的递送系统是目前 RNAi 递送系统中最具创新的方式。这些 RNAi 递送系统为田间害虫防治提供了切实可行的解决方案, 甚至通过靶标病媒害虫体内的病原菌达到控制病媒昆虫的为害。

RNAi 的基因特异性表明人们可以根据不同害虫选取不同的目的基因, 因此理论上可以作为特异高效的防治手段防治几乎任何有害昆虫。在未来实际应用中如何有效降低 RNAi 脱靶效应和 RNAi 抗性是我们面对的问题。使用多种 RNAi 递送系统可以减少可能的抗性发展。虽然目前 RNAi 机理还有许多尚未明确之处, 但是应用 RNAi 技术能有效地保护农作物抵抗害虫危害, 在农作物遗传改良进行精准抗虫方面具有重大的应用前景。随着有害生物基因序列不断被发现, 人们对 RNAi 的作用机理有越来越多的认识, 以及 RNAi 生产成本及功效进一步改善, 开发此

类特异性高、环境友好的生物农药,将在农业重要性害虫和病媒害虫综合防治领域发挥越来越重要的作用。

参考文献 (References)

- Alkhaibari AM, Lord AM, Maffei T, Bull JC, Olivares FL, Samuels RI, Butt TM, 2018. Highly specific host-pathogen interactions influence *Metarhizium brunneum* blastospore virulence against *Culex quinquefasciatus* larvae. *Virulence*, 9(1): 1449–1467.
- Andrade CE, Hunter WB, 2016. RNA interference-natural gene-based technology for highly specific pest control (HiSPeC)// Abdurakhmonov IY (ed.). RNA Interference. (Croatia: InTechOpen, London). 391–409.
- Avila LA, Chandrasekar R, Wilkinson KE, Balthazor J, Heerman M, Bechard J, Brown S, Park Y, Dhar S, Reeck GR, Tomich JM, 2018. Delivery of lethal dsRNAs in insect diets by branched amphiphilic peptide capsules. *Journal of Controlled Release*, 273: 139–146.
- 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.
- Bolognesi R, Ramaseshadri P, Anderson J, Bachman P, Clinton W, Flannagan R, Ilagan O, Lawrence C, Levine S, Moar W, Mueller G, Tan J, Uffman J, Wiggins E, Heck G, Segers G, 2012. Characterizing the mechanism of action of double-stranded RNA activity against western corn rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera* LeConte). *PLoS ONE*, 7(10): e47534.
- Cao M, Gatehouse JA, Fitches EC, 2018. A systematic study of RNAi effects and dsRNA stability in *Tribolium castaneum* and *Acyrtosiphon pisum*, following injection and ingestion of analogous dsRNAs. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(4): 1079.
- Cappelle K, de Oliveira CF, Van Eynde B, Christiaens O, Smagghe G, 2016a. 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.
- Cappelle K, Smagghe G, Dhaenens M, Meeus I, 2016b. Israeli acute paralysis virus infection leads to an enhanced RNA interference response and not its suppression in the bumblebee *Bombus terrestris*. *Viruses*, 8(12): 334.
- Carthew RW, Sontheimer EJ, 2009. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*, 136(4): 642–655.
- Castellanos NL, Smagghe G, Sharma R, Oliveira EE, Christiaens O, 2019. Liposome encapsulation and EDTA formulation of dsRNA targeting essential genes increase oral RNAi-caused mortality in the Neotropical stink bug *Euschistus heros*. *Pest Management Science*, 75(2): 537–548.
- Chen X, Li L, Hu Q, Zhang B, Wu W, Jin F, Jiang J, 2015. Expression of dsRNA in recombinant *Isaria fumosorosea* strain targets the *TLR7* gene in *Bemisia tabaci*. *BMC Biotechnology*, 15(1): 64.
- Chen J, Lu HR, Zhang L, Liao CH, Han Q, 2019. RNA interference-mediated knockdown of 3,4-dihydroxyphenylacetaldehyde synthase affects larval development and adult survival in the mosquito *Aedes aegypti*. *Parasites and Vectors*, 12(1): 311.
- Choi MY, VanderMeer RK, 2019. Phenotypic effects of PBAN RNAi using oral delivery of dsRNA to corn earworm (Lepidoptera: Noctuidae) and tobacco budworm larvae. *Journal of Economic Entomology*, 112(1): 434–439.
- Christiaens O, Tardajos MG, Martinez Reyna ZL, Dash M, Dubruel P, Smagghe G, 2018. Increased RNAi efficacy in *Spodoptera exigua* via the formulation of dsRNA with guanylated polymers. *Frontiers in Physiology*, 9: 316–316.
- Chung SH, Jing X, Luo Y, Douglas AE, 2018. Targeting symbiosis-related insect genes by RNAi in the pea aphid-*Buchnera symbiosis*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 95: 55–63.
- Cruz C, Tayler A, Whyard S, 2018. RNA interference-mediated knockdown of male fertility genes in the Queensland fruit fly *Bactrocera tryoni* (Diptera: Tephritidae). *Insects*, 9(3): 96.
- Das S, Debnath N, Cui Y, Unrine J, Palli SR, 2015. Chitosan, carbon quantum dot, and silica nanoparticle mediated dsRNA delivery for gene silencing in *Aedes aegypti*: A comparative analysis. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 7(35): 19530–19535.
- Deng P, Xu QY, Fu KY, Guo WC, Li GQ, 2018. RNA interference against the putative insulin receptor substrate gene *chico* affects metamorphosis in *Leptinotarsa decemlineata*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 103: 1–11.
- Dhandapani RK, Gurusamy D, Howell JL, Palli SR, 2019. Development of CS-TPP-dsRNA nanoparticles to enhance RNAi efficiency in the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Scientific Reports*, 9(1): 8775.
- Edwards CH, Baird J, Zinser E, Woods DJ, Shaw S, Campbell EM, Bowman AS, 2018. RNA interference in the cat flea, *Ctenocephalides felis*: Approaches for sustained gene knockdown and evidence of involvement of *Dicer-2* and *Argonaute2*. *International Journal for Parasitology*, 48(13): 993–1002.
- Ellango R, Asokan R, Chandra GS, Kumar NKK, Mahmood R,

- Ramamurthy VV, 2018. Tyrosine Hydroxylase, a potential target for the RNAi-mediated management of diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). *Florida Entomologist*, 101(1): 1–5.
- Fernando DD, Marr EJ, Zakrzewski M, Reynolds SL, Burgess STG, Fischer K, 2017. Gene silencing by RNA interference in *Sarcoptes scabiei*: A molecular tool to identify novel therapeutic targets. *Parasites and Vectors*, 10(1): 289.
- 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.
- Fu S, Liu ZX, Chen JZ, Sun GX, Sun CY, Yand G, 2019. Plant-mediated RNA interference in insect pests. *Acta Entomologica Sinica*, 62(12): 1448–1468. [傅淑, 刘昭霞, 陈金芝, 孙庚晓, 孙翠英, 杨广, 2019. 植物介导的害虫 RNA 干扰. 昆虫学报, 62(12): 1448–1468.]
- Galay RL, Hernandez EP, Talactac MR, Maeda H, Kusakisako K, Umemiya-Shirafuji R, Mochizuki M, Fujisaki K, Tanaka T, 2016. Induction of gene silencing in *Haemaphysalis longicornis* ticks through immersion in double-stranded RNA. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 7(5): 813–816.
- Ganbaatar O, Cao B, Zhang Y, Bao D, Bao W, Wuriyanghan H, 2017. Knockdown of *Mythimna separata* chitinase genes via bacterial expression and oral delivery of RNAi effectors. *BMC Biotechnology*, 17(1): 9.
- Grover S, Jindal V, Banta G, Taning CNT, Smagghe G, Christiaens O, 2019. Potential of RNA interference in the study and management of the whitefly, *Bemisia tabaci*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 100(2): e21522.
- Gu J, Liu M, Deng Y, Peng H, Chen X, 2011. Development of an efficient recombinant mosquito densovirus-mediated RNA interference system and its preliminary application in mosquito control. *PLoS ONE*, 6(6): 1–10.
- Guan RB, Li HC, Fan YJ, Hu SR, Christiaens O, Smagghe G, Miao XX, 2018. A nuclease specific to lepidopteran insects suppresses RNAi. *Journal of Biological Chemistry*, 293(16): 6011–6021.
- Guo S, Zhao Z, Liu L, Li Z, Shen J, 2018. Comparative transcriptome analyses uncover key candidate genes mediating flight capacity in *Bactrocera dorsalis* (Hendel) and *Bactrocera correcta* (Bezzi) (Diptera: Tephritidae). *International Journal of Molecular Sciences*, 19(2): 396.
- 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.
- Hoang KP, Teo TM, Ho TX, Le VS, 2016. Mechanisms of sex determination and transmission ratio distortion in *Aedes aegypti*. *Parasit and Vectors*, 9(1): 49.
- Hu Q, Wu W, 2016. Recombinant fungal entomopathogen RNAi target insect gene. *Bioengineered Bugs*, 7(6): 504–507.
- Hu SR, Guan RB, Li HC, Miao XX, 2019. Application of RNAi in insect pest management: Important progress and problems. *Acta Entomologica Sinica*, 62(4): 506–515. [胡少茹, 关若冰, 李海超, 苗雪霞, 2019. RNAi 在害虫防治中应用的重要进展及存在问题. 昆虫学报, 62(4): 506–515.]
- Huang JH, Liu Y, Lin YH, Belles X, Lee HJ, 2018. Practical use of RNA interference: Oral delivery of double-stranded RNA in liposome carriers for cockroaches. *Journal of Visualized Experiments*, 135: 683–693.
- Israni B, Rajam MV, 2017. Silencing of ecdysone receptor, insect intestinal mucin and sericotropin genes by bacterially produced double-stranded RNA affects larval growth and development in *Plutella xylostella* and *Helicoverpa armigera*. *Insect Molecular Biology*, 26(2): 164–180.
- Katoch R, Thakur N, 2012. Insect gut nucleases: A challenge for RNA interference mediated insect control strategies. *International Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 1: 198–203.
- Khan AM, Ashfaq M, Khan AA, Naseem MT, 2018. Evaluation of potential RNA-interference-target genes to control cotton mealybug, *Phenacoccus solenopsis* (Hemiptera: Pseudococcidae). *Insect Science*, 25(5): 778–786.
- Khan AM, Ashfaq M, Kiss Z, Khan AA, Mansoor S, Falk BW, 2013. Use of recombinant tobacco mosaic virus to achieve rna interference in plants against the citrus mealybug, *Planococcus citri* (Hemiptera: Pseudococcidae). *PLoS ONE*, 8(9): e73657.
- Killiny N, Hajeri S, Tiwari S, Gowda S, Stelinski LL, 2014. Double-stranded RNA uptake through topical application, mediates silencing of five *CYP4* genes and suppresses insecticide resistance in *Diaphorina citri*. *PLoS ONE*, 9(10): e110536.
- Kim JH, Moreau JA, Zina JM, Mazgaen L, Yoon KS, Pittendrigh BR, Clark JM, 2018. Identification and interaction of multiple genes resulting in DDT resistance in the 91-R strain of *Drosophila melanogaster* by RNAi approaches. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 151: 90–99.
- Knorr E, Fishilevich E, Tenbusch L, Frey MLF, Rangasamy M, Billion A, Worden SE, Gandra P, Arora K, Lo W, Schulenberg G, Valverde-Garcia P, Vilcinskas A, Narva KE, 2018. Gene silencing in *Tribolium castaneum* as a tool for the targeted identification of candidate RNAi targets in crop pests. *Scientific Reports*, 8(1): 2061.
- Kolliopoulou A, Taning CNT, Smagghe G, Swevers L, 2017. Viral delivery of dsRNA for control of insect agricultural pests and vectors of human disease: prospects and challenges. *Frontiers in*

- Physiology*, 8: 399.
- Kumar M, Gupta GP, Rajam MV, 2009. Silencing of acetylcholinesterase gene of *Helicoverpa armigera* by siRNA affects larval growth and its life cycle. *Journal of Insect Physiology*, 55(3): 273–278.
- Kumar DR, Kumar PS, Gandhi MR, Al-Dhabi NA, Paulraj MG, Ignacimuthu S, 2016. Delivery of chitosan/dsRNA nanoparticles for silencing of wing development *vestigial* (*vg*) gene in *Aedes aegypti* mosquitoes. *International Journal of Biological Macromolecules*, 86: 89–95.
- Kunte N, McGraw E, Bell S, Held D, Avila LA, 2020. Prospects, challenges and current status of RNAi through insect feeding. *Pest Management Science*, 76(1): 26–41.
- Kupferschmidt K, 2013. A lethal dose of RNA. *Science*, 341(6147): 732–733.
- Lambrechts L, Scott TW, 2009. Mode of transmission and the evolution of arbovirus virulence in mosquito vectors. *Proceedings of The Royal Society B: Biological Sciences*, 276(1660): 1369–1378.
- Li H, Bowling AJ, Gandra P, Rangasamy M, Pence HE, McEwan RE, Khajuria C, Siegfried BD, Narva KE, 2018. Systemic RNAi in western corn rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera*, does not involve transitive pathways. *Insect Science*, 25(1): 45–56.
- Li J, Qian J, Xu Y, Yan S, Shen J, Yin M, 2019. A facile-synthesized star polycation constructed as a highly efficient gene vector in pest management. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, 7(6): 6316–6322.
- Li-Byarlay H, Li Y, Stroud H, Feng S, Newman TC, Kaneda M, Hou KK, Worley KC, Elisk CG, Wickline SA, Jacobsen SE, Ma J, Robinson GE, 2013. RNA interference knockdown of DNA methyl-transferase 3 affects gene alternative splicing in the honey bee. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 110(31): 12750–12755.
- Lin YH, Huang JH, Liu Y, Belles X, Lee HJ, 2016. Oral delivery of dsRNA lipoplexes to German cockroach protects dsRNA from degradation and induces RNAi response. *Pest Management Science*, 73(5): 960–966.
- Liu K, Xu Z, Yin M, Yang W, He B, Wei W, Shen J, 2014. A multifunctional perylene-3,4,9,10-tetracarboxylic diimide derivative (DTPDI) can be used as a recyclable specific Hg^{2+} ion sensor and an efficient DNA delivery carrier. *Journal of Materials Chemistry B*, 2(15): 2093–2096.
- Liu JS, Zhu WH, Liao WL, Bu XL, Jiang WY, 2016. dsRNA delivery methods for RNA interference in insects. *Acta Entomologica Sinica*, 59(6): 682–691. [刘吉升, 朱文辉, 廖文丽, 卜晓玲, 江婉仪, 2016. 昆虫 RNA 干扰中双链 RNA 的转运方式. 昆虫学报, 59(6): 682–691.]
- Liu FZ, Li X, Zhao MH, Guo MJ, Han KH, Dong XX, Zhao J, Cai WL, Zhang QF, Hua HX, 2020. *Ultrabithorax* is a key regulator for the dimorphism of wings, a main cause for the outbreak of planthoppers in rice. *National Science Review*, 7(7): 1181–1189.
- Ma ZZ, Yan S, Shen J, 2019. dsRNA delivery methods for RNA interference in insects. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 56(2): 342–347. [马中正, 闫硕, 沈杰, 2019. 基于工程菌高效合成靶向昆虫基因的 dsRNA 的方法. 应用昆虫学报, 56(2): 342–347.]
- Mao J, Zeng F, 2012. Feeding-based RNA interference of a gap gene is lethal to the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. *PLoS ONE*, 7(11): e48718.
- Marques JT, Kim K, Wu PH, Alleyne TM, Jafari N, Carthew RW, 2010. Loqs and R2D2 act sequentially in the siRNA pathway in *Drosophila*. *Nature Structural and Molecular Biology*, 17(1): 24–30.
- Marr EJ, Sargison ND, Nisbet AJ, Burgess STG, 2015. Gene silencing by RNA interference in the house dust mite, *Dermatophagoides pteronyssinus*. *Molecular and Cellular Probes*, 29(6): 522–526.
- Mogilicherla K, Howell JL, Palli SR, 2018. Improving RNAi in the brown marmorated stink bug: Identification of target genes and reference genes for RT-qPCR. *Scientific Reports*, 8(1): 3720.
- Moriyama M, Hosokawa T, Tanahashi M, Nikoh N, Fukatsu T, 2016. Suppression of Bedbug's reproduction by RNA interference of *vitellogenin*. *PLoS ONE*, 11(4): e0153984.
- Murphy KA, Tabuloc CA, Cervantes KR, Chiu JC, 2016. Ingestion of genetically modified yeast symbiont reduces fitness of an insect pest via RNA interference. *Scientific Reports*, 6(1): 22587.
- 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.
- Nandety RS, Kuoy YW, Nouriy S, Falk BW, 2015. Emerging strategies for RNA interference (RNAi) applications in insects. *Bioengineered Bugs*, 6(1): 8–19.
- Niu J, Shen G, Christiaens O, Smagghe G, He L, Wang J, 2018. Beyond insects: Current status and achievements of RNA interference in mite pests and future perspectives. *Pest Management Science*, 74(12): 2680–2687.
- Oerke EC, 2006. Crop losses to pests. *The Journal of Agricultural Science*, 12(17): 423–428.

- Ohde T, Masumoto M, Miwa MM, 2009. Vestigial and scalloped in the ladybird beetle: A conserved function in wing development and a novel function in pupal ecdysis. *Insect Molecular Biology*, 432(32): 845–849.
- Palli SR, 2014. RNA interference in Colorado potato beetle: Steps toward development of dsRNA as a commercial insecticide. *Current Opinion in Insect Science*, 6: 1–8.
- Pan PL, Ye YX, Lou YH, Lu JB, Cheng C, Shen Y, Moussianb B, Zhang CX, 2018. A comprehensive omics analysis and functional survey of cuticular proteins in the brown planthopper. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(20): 5175–5180.
- Parsons KH, Mondal MH, McCormick CL, Flynt AS, 2018. Guanidinium-functionalized interpolyelectrolyte complexes enabling RNAi in resistant insect pests. *Biomacromolecules*, 19(4): 1111–1117.
- 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: 624–624.
- Price DRG, Gatehouse JA, 2008. RNAi-mediated crop protection against insects. *Trends in Biotechnology*, 26(7): 393–400.
- Rajagopal R, Sivakumar S, Agrawal N, Malhotra P, Bhatnagar RK, 2002. Silencing of midgut aminopeptidase N of *Spodoptera litura* by double-stranded RNA establishes its role as *Bacillus thuringiensis* toxin receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 277(49): 46849–46851.
- Ramesh Kumar D, Saravana Kumar P, Gandhi MR, Al-Dhabi NA, Paulraj MG, Ignacimuthu S, 2016. Delivery of chitosan/dsRNA nanoparticles for silencing of wing development *vestigial* (vg) gene in *Aedes aegypti* mosquitoes. *International Journal of Biological Macromolecules*, 86: 89–95.
- Saleh MC, van Rij RP, Hekele A, Gillis A, Foley E, O'Farrell PH, Andino R, 2006. The endocytic pathway mediates cell entry of dsRNA to induce RNAi silencing. *Nature Cell Biology*, 8(8): 793–802.
- Santos-Ortega Y, Killiny N, 2018. Silencing of sucrose hydrolase causes nymph mortality and disturbs adult osmotic homeostasis in *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 101: 131–143.
- Saurabh S, Vidyarthi AS, Prasad D, 2014. RNA interference: Concept to reality in crop improvement. *Planta*, 239(3): 543–564.
- Shen D, Zhou F, Xu Z, He B, Li M, Shen J, Yin M, An C, 2014. Systemically interfering with immune response by a fluorescent cationic dendrimer delivered gene suppression. *Journal of Materials Chemistry B*, 2(29): 4653–4659.
- Shen XJ, Yang G, 2016. Review of RNAi pathways and their core components in insects. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 53(3): 446–455. [沈修婧, 杨广, 2016. 昆虫 RNAi 通路及其核心元件的研究综述. *应用昆虫学报*, 53(3): 446–455.]
- Sherman JH, Munyikwa T, Chan SY, Petrick JS, Witwer KW, Choudhuri S, 2015. RNAi technologies in agricultural biotechnology: The Toxicology Forum 40th Annual Summer Meeting. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 73(2): 671–680.
- Shim JK, Lee GS, Lee S, Lee KY, 2015. Oral ingestion of heat shock protein 70 dsRNA is lethal under normal and thermal stress conditions in the sweet potato whitefly, *Bemisia tabaci*. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 18(4): 797–800.
- Shukla JN, Kalsi M, Sethi A, Narva KE, Fishilevich E, Singh S, Mogilicherla K, Palli SR, 2016. Reduced stability and intracellular transport of dsRNA contribute to poor RNAi response in lepidopteran insects. *RNA Biol.*, 13(7): 656–669.
- Singh IK, Singh S, Mogilicherla K, Shukla JN, Palli SR, 2017. Comparative analysis of double-stranded RNA degradation and processing in insects. *Scientific Reports*, 7(1): 17059.
- Singh S, Gupta M, Pandher S, Kaur G, Rathore P, Palli SR, 2018. Selection of housekeeping genes and demonstration of RNAi in cotton leafhopper, *Amrasca biguttula biguttula* (Ishida). *PLoS ONE*, 13(1): e0168921.
- Sun Y, Sparks C, Jones H, Riley M, Francis F, Du W, Xia L, 2019. Silencing an essential gene involved in infestation and digestion in grain aphid through plant-mediated RNA interference generates aphid-resistant wheat plants. *Plant Biotechnology Journal*, 17(5): 852–854.
- Tang B, Wang S, Zhang F, 2010. Two storage hexamerins from the beet armyworm *Spodoptera exigua*: Cloning, characterization and the effect of gene silencing on survival. *BMC Molecular Biology*, 34(423): 345–349.
- Taning CNT, Christiaens O, Li X, Swevers L, Casteels H, Maes M, Smagghe G, 2018. Engineered flock house virus for targeted gene suppression through RNAi in fruit flies (*Drosophila melanogaster*) *in vitro* and *in vivo*. *Frontiers in Physiology*, 9: 805.
- Taning CNT, Christiaens O, Berkvens N, Casteels H, Maes M, Smagghe G, 2016. Oral RNAi to control *Drosophila suzukii*: Laboratory testing against larval and adult stages. *Journal of Pest Science*, 89(3): 803–814.
- Taracena ML, Oliveira PL, Almendares O, Umana C, Lowenberger C, Dotson EM, Paiva-Silva GO, Pennington PM, 2015.

- Genetically modifying the insect gut microbiota to control Chagas disease vectors through systemic RNAi. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 9(2): e0003358.
- Tariq K, Ali A, Davies TGE, Naz E, Naz L, Sohail S, Hou M, Ullah F, 2019. RNA interference-mediated knockdown of voltage-gated sodium channel (*MpNav*) gene causes mortality in peach-potato aphid, *Myzus persicae*. *Scientific Reports*, 9(1): 5291.
- Thairu MW, Skidmore IH, Bansal R, Nováková E, Hansen TE, Li-Byarlay H, Wickline SA, Hansen AK, 2017. Efficacy of RNA interference knockdown using aerosolized short interfering RNAs bound to nanoparticles in three diverse aphid species. *Insect Molecular Biology*, 26(3): 356–368.
- 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.
- Tsai HY, Chen CCG, Darryl Conte J, Moresco JJ, Chaves DA, Mitani S, John RY, Tsai MD, Mello CC, 2015. A ribonuclease coordinates siRNA amplification and mRNA cleavage during RNAi. *Cell*, 160(3): 407–419.
- Upadhyay SK, Singh H, Dixit S, Mendu V, Verma PC, 2016. Molecular characterization of vitellogenin and vitellogenin receptor of *Bemisia tabaci*. *PLoS ONE*, 11(5): e0155306.
- Vieira PH, Bomfim L, Atella GC, Masuda H, Ramos I, 2018. Silencing of *RpATG6* impaired the yolk accumulation and the biogenesis of the yolk organelles in the insect vector *R. prolixus*. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 12(5): 1–19.
- Wang Y, Zhang H, Li H, Miao X, 2011. Second-generation sequencing supply an effective way to screen RNAi targets in large scale for potential application in pest insect control. *PLoS ONE*, 6(4): e18644.
- Wang Z, Li T, Ni H, Wang G, Liu X, Cao Y, Li W, Meng F, 2018a. Transgenic soybean plants expressing Spb18S dsRNA exhibit enhanced resistance to the soybean pod borer *Leguminivora glycinivorella* (Lepidoptera: Olethreutidae). *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 98(2): e21461.
- Wang JD, Wang YR, Wang YZ, Wang WZ, Wang R, Gao SJ, 2018b. RNA interference of tubulin genes has lethal effects in *Mythimna separate*. *Gene*, 670: 1–6.
- Wang K, Peng Y, Chen J, Peng Y, Wang X, Shen Z, Han Z, 2019. Comparison of efficacy of RNAi mediated by various nanoparticles in the rice striped stem borer (*Chilo suppressalis*). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 165: 104467.
- Walker WB III, Allen ML, 2011. RNA interference mediated knockdown of *IAP* in *Lygus lineolaris* induces mortality in adult and preadult life stages. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 172(3): 1714–1724.
- Walski T, De Schutter K, Cappelle K, van Damme EJM, Smagghe G, 2017. Distribution of glycan motifs at the surface of midgut cells in the cotton leafworm (*Spodoptera littoralis*) demonstrated by lectin binding. *Frontiers in Physiology*, 8: 1020–1020.
- Whangbo JS, Hunter CP, 2008. Environmental RNA interference. *Trends in Genetics*, 24(6): 297–305.
- 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 of The Royal Society B: Biological Sciences*, 283(1825): 20160042.
- Whitten MMA, 2019. Novel RNAi delivery systems in the control of medical and veterinary pests. *Curr. Opin. Insect Sci.*, 34: 1–6.
- Whyard S, Singh AD, Wong S, 2009. Ingested double-stranded RNAs can act as species-specific insecticides. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 39(11): 824–832.
- Whyard S, Erdelyan C, Partridge LA, Singh DA, Beebe WN, Capina R, 2015. Silencing the buzz: A new approach to population suppression of mosquitoes by feeding larvae double-stranded RNAs. *Parasit and Vectors*, 8(1): 96.
- Wu W, Gu D, Yan S, Li Z, 2019. RNA interference of endoglucanases in the formosan subterranean termite *Coptotermes formosanus shiraki* (Blattodea: Rhinotermitidae) by dsRNA injection or ingestion. *Journal of Insect Physiology*, 112: 15–22.
- Wuriyangan H, Falk BW, 2013. RNA interference towards the potatopsyllid, *Bactericera cockerelli*, is induced in plants infected with recombinant tobacco mosaic virus (TMV). *PLoS ONE*, 8(6): e66050.
- Wynant N, Santos D, Van Wielendaele P, Vanden Broeck J, 2014a. Scavenger receptor-mediated endocytosis facilitates RNA interference in the desert locust, *Schistocerca gregaria*. *Insect Molecular Biology*, 23(3): 320–329.
- Wynant N, Santos D, Verdonck R, Spit J, Van Wielendaele P, Vanden Broeck J, 2014b. Identification, functional characterization and phylogenetic analysis of double stranded RNA degrading enzymes present in the gut of the desert locust, *Schistocerca gregaria*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 46(3): 1–8.
- Xu Z, He B, Wei W, Liu K, Yin M, Yang W, Shen J, 2014. Highly water-soluble perylene diimide-cored poly(amido amine) vector for efficient gene transfection. *Journal of Materials Chemistry B*, 2(20): 3079–3086.
- Yan S, Qian J, Cai C, Ma Z, Li J, Yin M, Ren B, Shen J, 2020. Spray

- method application of transdermal dsRNA delivery system for efficient gene silencing and pest control on soybean aphid *Aphis glycines*. *Journal of Pest Science*, 93(1): 449–459.
- Yan S, Ren BY, Shen J, 2021. Nanoparticle-mediated double-stranded RNA delivery system: A promising approach for sustainable pest management. *Insect Science*, 28(1): 21–34.
- Yang X, He C, Xie W, Liu Y, Xia J, Yang Z, Guo L, Wen Y, Wang S, Wu Q, Yang F, Zhou X, Zhang Y, 2016. Glutathione *S*-transferases are involved in thiamethoxam resistance in the field whitefly *Bemisia tabaci* Q (Hemiptera: Aleyrodidae). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 134: 73–78.
- Yang X, Xie W, Li RM, Zhou XM, Wang SL, Wu QJ, Yang NN, Xia JX, Yang ZZ, Guo LT, Liu YT, Zhang YJ, 2017. RNA interference-mediated knockdown of the hydroxyacid-oxoacid transhydrogenase gene decreases thiamethoxam resistance in adults of the whitefly *Bemisia tabaci*. *Scientific Reports*, 7(1): 41201.
- Yoon JS, Gurusamy D, Palli SR, 2017. Accumulation of dsRNA in endosomes contributes to inefficient RNA interference in the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 90: 53–60.
- Yoon JS, Sahoo DK, Maiti IB, Palli SR, 2018. Identification of target genes for RNAi-mediated control of the twospotted spider mite. *Scientific Reports*, 8: 14687.
- Yu X, Gowda S, Killiny N, 2017. Double-stranded RNA delivery through soaking mediates silencing of the muscle protein 20 and increases mortality to the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*. *Pest Management Science*, 73(9): 1846–1853.
- Yu X, Killiny N, 2018. RNA interference of two glutathione *S*-transferase genes, *Diaphorina citri* DcGSTe2 and DcGSTd1, increases the susceptibility of Asian citrus psyllid (Hemiptera: Liviidae) to the pesticides fenpropathrin and thiamethoxam. *Pest Management Science*, 74(3): 638–647.
- Zamore PD, Tuschl T, Sharp PA, Bartel DP, 2000. RNAi: Double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell*, 101(1): 25–33.
- Zhang X, Zhang J, Zhu KY, 2010. Chitosan/double-stranded RNA nanoparticle-mediated RNA interference to silence chitin synthase genes through larval feeding in the African malaria mosquito (*Anopheles gambiae*). *Insect Molecular Biology*, 19(5): 683–693.
- Zhang J, Khan SA, Hasse C, Ruf S, Heckel DG, Bock R, 2015a. Full crop protection from an insect pest by expression of long double-stranded RNAs in plastids. *Science*, 347(6225): 991–994.
- Zhang X, Mysore K, Flannery E, Michel K, Severson DW, Zhu KY, Duman-Scheel M, 2015b. Chitosan/interfering RNA nanoparticle mediated gene silencing in disease vector mosquito larvae. *Journal of Visualized Experiments*, 97: 181–191.
- Zhang Q, Hua G, Adang MJ, 2015c. Chitosan/DsiRNA nanoparticle targeting identifies AgCad1 cadherin in *Anopheles gambiae* larvae as an *in vivo* receptor of *Cry11Ba* toxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *jegasethan*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 60: 33–38.
- Zhang J, Khan SA, Heckel DG, Bock R, 2017. Next-generation insect-resistant plants: RNAi-mediated crop protection. *Trends in Biotechnology*, 35(9): 871–882.
- Zhang T, Zhi JR, Ye M, 2018. Progress of RNA interference on insect gene function. *Journal of Mountain Agriculture and Biology*, 37(6): 63–69. [张涛, 郑军锐, 叶茂, 2018. RNAi 在昆虫基因功能研究中的应用进展. 山地农业生物学报, 37(6): 63–69.]
- Zhang Y, Zhang Y, Fu M, Yin G, Sayre RT, Pennerman KK, Yang F, 2018a. RNA interference to control Asian corn borer using dsRNA from a novel glutathione-*S*-transferase gene of *Ostrinia furnacalis* (Lepidoptera: Crambidae). *Journal of Insect Science*, 18(5): 16.
- Zhang Y, Cui J, Zhou Y, Cao J, Gong H, Zhang H, Zhou J, 2018b. Liposome mediated double-stranded RNA delivery to silence ribosomal protein P0 in the tick *Rhipicephalus haemaphysaloides*. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 9(3): 638–644.
- Zhao YY, Liu F, Yang G, You MS, 2011. *PsOr1*, a potential target for RNA interference-based pest management. *Insect Molecular Biology*, 20(1): 97–104.
- 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.
- Zotti MJ, Smagghe G, 2015. RNAi technology for insect management and protection of beneficial insects from diseases: Lessons, challenges and risk assessments. *Neotropical Entomology*, 44(3): 197–213.
- Zotti M, Dos Santos EA, Cagliari D, Christiaens O, Taning CNT, Smagghe G, 2018. RNA interference technology in crop protection against arthropod pests, pathogens and nematodes. *Pest Management Science*, 74(6): 1239–1250.