

萝卜蚜 *LeATPf* 基因的克隆及其 RNA 干扰 制剂对萝卜蚜的防治效果研究*

张 浩^{1**} 王金彦¹ 赵 杰² 陈义娟¹ 蒋杰贤¹ 季香云^{1***}

(1. 上海市农业科学院生态环境保护研究所, 上海 201403; 2. 上海市浦东新区农业技术推广中心, 上海 201201)

摘 要 【目的】克隆萝卜蚜 *Lipaphis erysimi* (Kaltenbach) 的三磷酸腺苷合酶 f 亚基 (ATP synthases subunit f, *LeATPf*) 基因, 并利用 RNA 干扰技术抑制该基因表达, 分析复配 RNA 干扰剂对萝卜蚜的防治效果, 推动以 RNA 干扰为核心的害虫绿色防控新技术。【方法】利用同源克隆技术获得萝卜蚜 *LeATPf* 基因的全长 cDNA, 通过 RNA 干扰技术沉默其基因表达; 采用浸叶法测定不同浓度的复配 RNA 干扰剂对萝卜蚜的杀虫效果, 并通过田间小区试验测定 RNA 干扰剂对萝卜蚜的虫口减退率和田间防治效果。【结果】萝卜蚜 *LeATPf* 基因编码长度为 324 bp 的 cDNA 序列, 与其它 5 种蚜虫的 *ATPf* 基因同源性在 88% 以上, 且 *LeATPf* 基因主要在 2 龄期萝卜蚜中表达; 喷施 RNA 干扰剂可有效抑制 *LeATPf* 基因的表达, 且高浓度的 RNA 干扰剂 (200.00 mg/L) 对萝卜蚜的室内杀虫效果与吡虫啉处理组无显著差异 ($P>0.05$); 在田间试验中, 中高浓度的 RNA 干扰剂 (50.00、100.00 和 200.00 mg/L) 在处理第 3 和第 7 天对萝卜蚜的虫口减退率和防治效果与吡虫啉处理组无显著差异 ($P>0.05$), 但在处理后 14 d 对萝卜蚜的虫口减退率和防治效果显著高于吡虫啉处理组 ($P<0.05$)。【结论】针对 *LeATPf* 基因设计并配置的中高浓度的 RNA 干扰剂对萝卜蚜的防治效果与吡虫啉相当, 但是其药效持续性优于吡虫啉; *LeATPf* 基因是开发萝卜蚜 RNA 干扰制剂的良好靶标基因。

关键词 RNA 干扰; 萝卜蚜; 三磷酸腺苷合酶 f 亚基; 害虫防治; 新型农药

Cloning the *LeATPf* gene of *Lipaphis erysimi* and evaluating the effectiveness of RNA interference knockdown of this gene as a means of controlling *L. erysimi*

ZHANG Hao^{1**} WANG Jin-Yan¹ ZHAO Jie² CHEN Yi-Juan¹
JIANG Jie-Xian¹ JI Xiang-Yun^{1***}

(1. Eco-environmental Protection Research Institute, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 201403, China;

2. Shanghai Pudong New District Agro-technology Extension Center, Shanghai 201201, China)

Abstract 【Objectives】To clone the ATP synthases subunit f gene of *Lipaphis erysimi* (Kaltenbach) (*LeATPf*) and assess the effectiveness of RNAi (RNA interference) as a more environmentally-friendly way of controlling *L. erysimi*. 【Methods】The full-length cDNA sequence of the *LeATPf* gene was obtained using the reverse transcription technique and expression of the gene silenced using RNA interference. The effect of exposing *L. erysimi* to a residual film of the RNAi preparation was measured under laboratory conditions, and the effect of spraying the RNAi preparation on *L. erysimi* in the field was measured in a field experiment. 【Results】The cDNA sequence encoding the *LeATPf* gene is 324 bp in length, and is more than 90% homologous with the corresponding gene in another five aphid species. The *LeATPf* gene was mainly expressed in 2nd instar *L.*

*资助项目 Supported projects: 上海市科技兴农项目 (2019-02-08-00-12-F01125); 上海市农业科学院卓越团队建设项目 (2022-017, 2018[B-01])

**第一作者 First author, E-mail: zhangvhaov@126.com

***通讯作者 Corresponding author, E-mail: hwfy2002@163.com

收稿日期 Received: 2021-10-25; 接受日期 Accepted: 2022-04-06

erysimi. Spraying aphids with the RNAi preparation effectively inhibited expression of the *LeATP β* gene. The corrected mortality of *L. erysimi* following treatment with the RNAi preparation (200.00 mg/L) was not significantly different to that following treatment with 70% imidacloprid after 1, 3 or 5 days ($P < 0.05$). A field experiment indicated that the rate and magnitude of a population's decline following treatment with the RNAi preparation (50.00, 100.00 or 200.00 mg/L) were not significantly different from the result of spraying 70% imidacloprid after 1, 3 or 7 days ($P < 0.05$). However, the rate and magnitude of population decline using the RNAi preparation were significantly higher than that achieved with 70% imidacloprid on the 14th day after treatment ($P < 0.05$). **[Conclusion]** The effectiveness of medium to high concentrations (50.00, 100.00 and 200.00 mg/L) of an RNAi preparation (ds*LeATP β*) to control *L. erysimi* was equivalent to imidacloprid, except that the effects of the RNAi preparation lasted longer than that of imidacloprid. The *LeATP β* gene is a good target for developing an RNA interference preparation to control *L. erysimi* in the field.

Key words RNA interference; *Lipaphis erysimi*; ATP synthases subunit β ; pest control; new pesticide

萝卜蚜 *Lipaphis erysimi* (Kaltenbach) 属于半翅目 Homoptera、蚜科 Aphididae, 主要危害萝卜、白菜及油菜等十字花科作物, 是世界上分布最广泛的蚜虫之一 (胡玲玲等, 2004; Adachi-Hagimori *et al.*, 2011)。同时, 萝卜蚜还可以传播多种蔬菜病毒病, 造成更加严重的危害 (王峰等, 2017; 纪祥龙等, 2019)。目前, 对萝卜蚜的防控主要以化学防治为主, 但是随着害虫抗药性、环境污染、农药残留等问题日趋突出, 亟需探索新型高效的防控方法 (张秋圆等, 2019; 张鑫泽等, 2020)。

RNA 干扰剂也被称为 RNA 生物农药、RNA 杀虫剂, 是以靶向害虫生长发育关键基因的 dsRNA (Double-stranded RNA, dsRNA) 或 siRNA (Small interfering RNA, siRNA) 为杀虫活性成分的生物杀虫制剂 (田宏刚等, 2013)。通过引入外源的 dsRNA 或 siRNA 对靶标基因进行干扰, 降解 mRNA 沉默靶标基因的表达, 达到对害虫种群的可持续控制 (马中正等, 2019; Zheng *et al.*, 2019)。RNA 干扰剂具有杀虫效率高、物种专一性强、无毒、无残留等优点, 被称为农药生产史上的第三次科技革命 (史学凯等, 2017; 胡少茹等, 2019)。

随着基因组测序技术的不断发展, 大量与害虫生长发育及免疫相关的基因被发现, 为害虫的遗传学控制提供了丰富的候选靶标, 推动了以 RNAi 为核心的病虫害防控技术的发展 (杨雨姮等, 2021)。目前, 已有大豆蚜 *Aphis glycines*、异色瓢虫 *Harmonia axyridis*、玉米螟 *Ostrinia*

furnalalis、褐飞虱 *Nilaparvata lugens*、棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 和马铃薯甲虫 *Leptinotarsa decemlineata* 等多种农业害虫的靶标基因被开发出来 (Wang *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2013; Guan *et al.*, 2017; 马中正等, 2019; Yan *et al.*, 2020a, 2020b, 2021; Mehlhorn *et al.*, 2021)。RNA 生物农药开发利用的另外一个关键问题是成本。当前生产 dsRNA 的方法主要包括化学合成、体外合成和微生物发酵合成 3 种方式。马中正等 (2019) 利用 L4440 质粒和大肠杆菌 HT115 (DE3) 菌株, 建立了一种经济、高效的昆虫靶标基因 dsRNA 合成方法。也有研究者在酵母中构建能够合成 dsRNA 的菌株, 提取发酵产物或者将菌体灭活处理后直接施用 (Mysore *et al.*, 2019)。例如加拿大的 Renaissance BioScience Corp 公司通过专属的酵母载体表达 dsRNA 饲喂马铃薯甲虫, 能够精准地抑制靶标基因的表达, 而且对马铃薯甲虫致死率高达 98.3% (<https://renaissancebioscience.com/>)。

三磷酸腺苷 (Adenosine triphosphate, ATP) 作为一种辅酶, 具有改善机体代谢的作用, 可参与体内脂肪、蛋白质、糖、核酸以及核苷酸的代谢, 是体内能量的主要来源 (Elston *et al.*, 1998; Senior *et al.*, 2002)。ATP 通过具有旋转作用的 ATP 合成酶 (ATP synthases) 产生, ATP 合成酶占据细胞器的内膜并通过其膜域中的特定相互作用形成二聚体, 这一结构促使催化过程中转, 并适应于生长过程中在线粒体中与催化作用不直接相关的变化 (Spikes *et al.*, 2020)。ATP 合

成酶基因在生物体生长过程中非常重要,而这一特性符合 RNAi 生物农药筛选靶标基因的特性。本研究以萝卜蚜 ATP 合成酶基因为靶标,对其作为 RNAi 生物农药的可行性进行了研究。研究结果对于开发针对萝卜蚜的新型生物农药,减少化学农药使用,提高蔬菜产品的质量具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 供试虫源

2020 年 5 月,萝卜蚜采自上海市奉贤区庄行镇的萝卜菜地,带回实验室以萝卜饲养于温度为 25 °C、光周期为 16L:8D、相对湿度为 60% - 70% 的光照培养箱中。

1.2 萝卜蚜 *LeATP*f 基因的克隆

取 100 头萝卜蚜,使用 TRIzol® Reagent (Invitrogen) 进行总 RNA 的提取,严格按照实验手册要求进行。提取得到的总 RNA 样品,用分光光度计检测吸光值,1%琼脂凝胶电泳检测总 RNA 质量, - 80 °C 保存待用。使用试剂盒 ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (TOYOBO) 进行反转录,严格按照手册进行操作完成后,反应液稀释 10 倍,放置在 - 20 °C 备用。用 NCBI 数据库中的 Primer 3 软件设计引物。*LeATP*f 基因全长引物为 *LeATP*f F: ATGGGTTTTGGTGATTATCCG; *LeATP*f R: TTAATGGTGCTTGTAAGTTTCTA。以反转录得到的萝卜蚜 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,反应体系如下: cDNA template 2 μL; 2×PCR Mix 25 μL; *LeATP*f F 2 μL; *LeATP*f R 2 μL; Nuclease-free Water 19 μL。PCR 反应程序为: 95 °C 预变性 1 min, 95 °C 变性 30 s, 58 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 并进行 35 个循环, 72 °C 总延伸 10 min。反应结束后,将 PCR 产物样品委托上海铂尚生物技术有限公司进行测序。

1.3 *LeATP*f 的序列分析和系统进化分析

利用 SignalP 5.0 软件进行 *LeATP*f 基因信号肽预测(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>); 利用 EXPASY 计算 *LeATP*f 蛋白大小及等电点分

析(https://web.expasy.org/comptte_pi/); 利用 TMHMM 对 *LeATP*f 基因进行同源建模及蛋白质三维结构预测分析(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>); 用 ClustalX 软件分析 *LeATP*f 基因的序列一致性(Thompson *et al.*, 1997); 用 MEGA X 软件,构建 NJ 树(Bootstrap 值 1 000),进行系统进化分析(Tamura *et al.*, 2011),构建系统发育树所用的序列见表 1。

1.4 *LeATP*f 基因的表达谱分析

分别取不同发育时期的萝卜蚜进行 *LeATP*f 基因的表达分析。为了消除个体差异,每组样品进行 3 个生物学重复,每个重复由 30 头同一龄期虫体 RNA 反转录的 cDNA 等量混合而成。采用荧光定量 PCR (qRT-PCR) 进行 *LeATP*f 基因的表达分析。反应体系为: cDNA Template 2 μL; SYBR® Premix Ex Taq™ II 10 μL; Forward Primer 1 μL; Reverse Primer 1 μL; Nuclease-free Water 6 μL。采用两步法程序进行 RT-PCR 反应,反应体系如下: 95 °C 30 s, 95 °C 5 s, 60 °C 30 s, 40 个循环。*LeATP*f 基因的表达水平选用 18S rRNA (EF190265.1) 作为内参基因进行均一化处理。*LeATP*f F: GTCCATGGACCGTACGATCC; *LeATP*f R: CCCACCCATTCAGTGACCTC。*Le18s* F: TCGTACCGAGACGTTAGAGGT; *Le18s* R: TCGCCTTCGAACCTCTAACT 为实验所用引物。

1.5 RNA 干扰剂的制备及干扰效果分析

选取 *LeATP*f 基因区段进行 dsRNA 合成,所使用的引物分别为 ds*LeATP*f F: TAATACGACTCACTATAGGGCCATGGACCGTACGATCCTG; ds*LeATP*f R: TAATACGACTCACTATAGGGTG-AATCAATGGAGCAGCCGT。使用绿色荧光蛋白 (Green fluorescent protein, GFP) 作为对照,合成 dsRNA 引物为 dsGFP F: TAATACGACTCACTATAGGGGAGGACGACGGCAACTACAAG; dsGFP R: TAATACGACTCACTATAGGGGAA-CTCCAGCAGGACCATGT。dsRNA 的合成使用 MEGAscript™ T7 Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific) 试剂盒,通过 PCR 扩增得到两端均连接 T7 启动子序列的目的基因片段,参照试

表 1 构建系统发育树相关基因信息

Table 1 Phylogenetic tree gene information

序号 No.	分类 Classification	物种名称 Species	GeneBank 登录号 GeneBank accession no.	基因注释 Gene annotation
1	同翅目 Homoptera	桃蚜 <i>Myzus persicae</i>	XM_022321626.1	putative ATP synthase subunit f, mitochondrial
2	同翅目 Homoptera	麦双尾蚜 <i>Diuraphis noxia</i>	XM_015511227.1	putative ATP synthase subunit f, mitochondrial
3	同翅目 Homoptera	豌豆蚜 <i>Acyrtosiphon pisum</i>	DQ413223.1	isolate WHAP0250 mitochondrial ATP synthase F chain-like
4	同翅目 Homoptera	棉蚜 <i>Aphis gossypii</i>	XM_027987971.1	putative ATP synthase subunit f, mitochondrial
5	同翅目 Homoptera	高粱蚜 <i>Melanaphis sacchari</i>	XM_025344974.1	putative ATP synthase subunit f, mitochondrial
6	双翅目 Diptera	黑水虻 <i>Hermetia illucens</i>	XM_038067284.1	putative ATP synthase subunit f, mitochondrial
7	双翅目 Diptera	苹果实蝇 <i>Rhagoletis pomonella</i>	XM_036476426.1	putative ATP synthase subunit f, mitochondrial
8	双翅目 Diptera	家蝇 <i>Musca domestica</i>	XM_005175321.3	putative ATP synthase subunit f, mitochondrial
9	双翅目 Diptera	果蝇 <i>Drosophila busckii</i>	XM_017981853.1	putative ATP synthase subunit f, mitochondrial
10	双翅目 Diptera	嗜凤梨果蝇 <i>Drosophila ananassae</i>	XM_001960936.3	putative ATP synthase subunit f, mitochondrial
11	双翅目 Diptera	埃及伊蚊 <i>Aedes aegypti</i>	XM_021851559.1	ATP synthase subunit f, mitochondrial
12	双翅目 Diptera	斯氏按蚊 <i>Anopheles stephensi</i>	XM_036054820.1	putative ATP synthase subunit f, mitochondrial
13	鞘翅目 Coleoptera	玉米根萤叶甲 <i>Diabrotica virgifera virgifera</i>	XM_028273680.1	putative ATP synthase subunit f, mitochondrial
14	鞘翅目 Coleoptera	科罗拉多甲虫 <i>Leptinotarsa decemlineata</i>	XM_023167849.1	putative ATP synthase subunit f, mitochondrial
15	鞘翅目 Coleoptera	赤拟谷盗 <i>Tribolium castaneum</i>	XM_967046.4	ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit F2
16	半翅目 Hemiptera	温带臭虫 <i>Cimex lectularius</i>	XM_014389618.2	putative ATP synthase subunit f, mitochondrial
17	半翅目 Hemiptera	茶翅蝽 <i>Halyomorpha halys</i>	XM_014419330.2	putative ATP synthase subunit f, mitochondrial
18	鳞翅目 Lepidoptera	棕眼蝶 <i>Aricia agestis</i>	XM_042122188.1	putative ATP synthase subunit f, mitochondrial
19	鳞翅目 Lepidoptera	凤蝶 <i>Papilio xuthus</i>	NM_001312547.1	putative ATP synthase subunit f, mitochondrial
20	膜翅目 Hymenoptera	黄蜂 <i>Belonocnema treatae</i>	XM_033355189.1	putative ATP synthase subunit f, mitochondrial
21	等翅目 Isoptera	堆沙白蚁 <i>Cryptotermes secundus</i>	XM_023871624.2	putative ATP synthase subunit f, mitochondrial
22	甲壳纲 Crustacea	斑节虾 <i>Parastomatoda tepidiorum</i>	XM_016059795.2	putative ATP synthase subunit f, mitochondrial

剂盒说明书的 dsRNA 的合成体系和条件合成 dsRNA, 使用核酸酶消解模板 DNA 和单链 RNA, 并使用 MEGAclear™ dsRNA 纯化柱在 100 μ L 无核酸酶水中洗脱。使用核酸蛋白测定仪 (Eppendorf) 测定 dsRNA 浓度 (Ma *et al.*, 2022)。将合成的 ds*LeATPf* 稀释成 500 ng/ μ L 的 ds*LeATPf* 溶液 (含 2.5% SDS, 10% 甘油, 5% β -巯基乙醇, 50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.8), 均匀喷在萝卜幼苗以及虫体表面。每个处理进行 3 次重复, 每个重复处理 50 头萝卜蚜成虫。以喷施 dsGFP 溶液 (含 2.5% SDS, 10% 甘油, 5% β -巯基乙醇, 50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.8) 和喷施清水处理的萝卜蚜作为对照。5 d 后, 挑取其中 30 头健康的无翅成蚜, 样品在液氮速冻后, -80 $^{\circ}$ C 保存, 用于检测 *LeATPf* 基因的表达量, 引物及方法参照 1.4, 每处理设置 3 个重复。

1.6 室内施用 RNA 干扰剂对萝卜蚜的杀虫效果

RNA 干扰剂对萝卜蚜的杀虫效果采用浸叶法测定 (宋维虎等, 2020), 通过预备试验确定适宜浓度范围, dsRNA 溶液配置参照 Wang 等 (2011) 的配方配置, 将 ds*LeATPf* 溶液 (含 2.5% SDS, 10% 甘油, 5% β -巯基乙醇, 50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.8) 稀释成 5 个浓度 (12.50、25.00、50.00、100.00 和 200.00 mg/L), 按等比梯度加蒸馏水稀释, 以清水为空白对照, 每处理重复 3 次。分别选取不含有翅蚜的萝卜心叶, 在手持放大镜下, 用毛笔剔除死亡或过小的蚜虫, 每片心叶保留及补足至 50 头健康的无翅成蚜, 将带有蚜虫的叶片浸入药液 10 s, 然后用滤纸吸掉多余药液, 放入培养皿内, 置于 (25 $\pm$ 2) $^{\circ}$ C 培养箱中, 于 1、3 和 5 d 后记录存活和死亡的蚜虫数量 (用毛笔轻触蚜虫足和触角, 多次触碰不动者计为死亡), 并计算校正死亡率。校正死亡率 (%) = (处理死亡率 - 对照死亡率) / (1 - 对照死亡率) $\times$ 100。

1.7 田间施用 RNA 干扰剂对萝卜蚜的虫口减退率和田间防治效果

试验于 2020 年 9 月在上海农业科学院实验基地 (上海市奉贤区庄行镇) 的萝卜地进行, 所有萝卜地的环境条件和管理水平一致。药效试验

采取随机区组设计, 共设 5 个处理和 1 个药剂对照 (70% 吡虫啉水分散粒剂, 拜耳) 和 1 个清水空白对照, 每处理 3 次重复, 每个小区大小为 10 m², 区组间留有保护行。每处理选大小相差较小的萝卜各 10 株, 每株调查其蚜虫数量并挂牌标记。按试验设计配置药液, ds*LeATPf* 溶液 (含 2.5% SDS, 10% 甘油, 5% β -巯基乙醇, 50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.8) 配置参照 Wang 等 (2011) 的配方配置, dsRNA 用药量为 12.50、25.00、50.00、100.00 和 200.00 mg/L, 用水量为 900 L/hm²。用背负式自动喷雾器 (新加坡利农, 工作压力 45 Pa, 喷孔速率 710 mL/min) 喷雾, 以叶片正反两面表面润湿为度, 分别于施药后 1、3、7 和 14 d 调查残存的活虫数量, 计算萝卜蚜的虫口减退率和防治效果。

虫口减退率 (%) = (处理前虫口数 - 处理后虫口数) / (处理前虫口数) $\times$ 100,

防治效果 (%) = (处理区虫口减退率 - 对照区虫口减退率) / (1 - 对照区虫口减退率) $\times$ 100。

1.8 数据分析

根据 RT-PCR 的扩增曲线和溶解曲线判断引物质量, 数据分析参照 2^{- $\Delta\Delta$ CT} 法进行 (Livak and Schmittgen, 2001)。 *LeATPf* 基因在不同组织的表达量、喷施 dsRNA 后 *LeATPf* 基因表达量, 以及不同浓度 dsRNA 处理后萝卜蚜的校正死亡率、田间虫口减退率和防治效果等数据间的差异显著性分析均采用单因素方差分析, 并应用 Tukey's HSD 法进行处理间的差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 萝卜蚜 *LeATPf* 基因的克隆与序列分析

通过基因克隆和同源序列比对分析, 在萝卜蚜中获得一个长度为 324 bp 的基因序列, 与 NCBI 数据比对, 该序列与其它蚜虫的 ATP synthase subunit f 的序列一致性在 88% 以上, 并将其命名为 *LeATPf*。将萝卜蚜 *LeATPf* 与 5 种蚜虫的 ATP synthase subunit f 基因进行多重比对分析, 结果显示, 在不同物种中, 与 *LeATPf* 基因的氨基酸序列一致性较高分别是: 桃蚜 *Myzus persicae* 98%; 棉

蚜 *Aphis gossypii* 88%; 豌豆蚜 *Acyrtosiphon pisum* 95%; 麦双尾蚜 *Diuraphis noxia* 90%; 高粱蚜 *Melanaphis sacchari* 89% (图 1)。图 1 结果表明, *LeATPf* 共编码 107 个氨基酸序列, 无信号肽序列, 预测蛋白大小为 12.461 ku, 等电点为 9.95, 包含一个跨膜结构 (74-96 aa) (图 1)。

2.2 萝卜蚜 *LeATPf* 基因的系统进化分析

利用 MEGA X 对萝卜蚜及其它 22 种不同昆虫的 ATP synthase subunit f 基因进行系统进化树分析, 以甲壳纲的斑节虾 *Parasteatoda tepidariorum*

ATP synthase subunit f 基因为外群。结果显示, 不同昆虫的 ATP synthase subunit f 基因分别聚集在两个大支上, 萝卜蚜 *LeATPf* 与半翅目蚜科的其它 5 种蚜虫聚集在一支上, 随后与 2 种半翅目昆虫聚集成一个大支, 鳞翅目、等翅目、双翅目以及鞘翅目昆虫共同聚集在一支上, 其中双翅目的蚊虫和黑水虻 *Hermetia illucens* 的 *ATPf* 更为接近, 聚集在一个小支上, 而蝇类昆虫与鞘翅目昆虫的 *ATPf* 更为接近, 聚集在一个小支上, 但膜翅目的黄蜂 *Belonocnema treatae* 与其他所有昆虫进化关系均较远, 形成单独的一支 (图 2)。

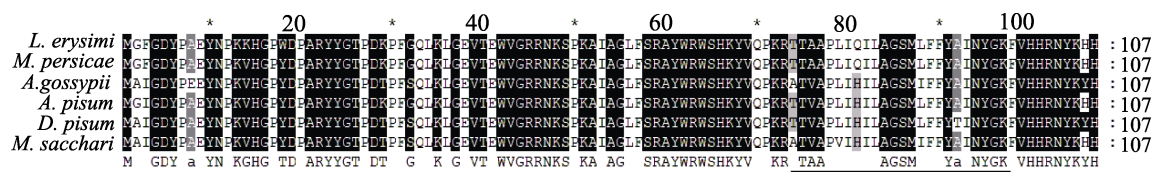


图 1 萝卜蚜 *LeATPf* 基因与其它昆虫同源蛋白的氨基酸序列比较

Fig. 1 Comparison of amino acid sequences of *LeATPf* protein in *Lipaphis erysimi* and homologous proteins in other insects

黑色阴影表示一致的氨基酸序列; 黑色横线表示跨膜结构; * 分别代表第 10、30、50、70 和第 90 个氨基酸。

L. erysimi: 萝卜蚜; *M. persicae*: 桃蚜 (XM_022321626.1); *A. gossypii*: 棉蚜 (XM_027987971.1);

A. pisum: 豌豆蚜 (NM_001126211.2); *D. noxia*: 麦双尾蚜 (XM_015511227.1);

M. sacchari: 高粱蚜 (XM_025344974.1)。

The shaded dark backgrounds are common amino acids; Black horizontal lines are transmembrane structure;

The * represents the 10th, 30th, 50th, 70th and 90th amino acids, respectively. *L. erysimi*: *Lipaphis erysimi*;

M. persicae: *Myzus persicae* (XM_022321626.1); *A. gossypii*: *Aphis gossypii* (XM_027987971.1);

A. pisum: *Acyrtosiphon pisum* (NM_001126211.2); *D. noxia*: *Diuraphis noxia* (XM_015511227.1);

M. sacchari: *Melanaphis sacchari* (XM_025344974.1)。

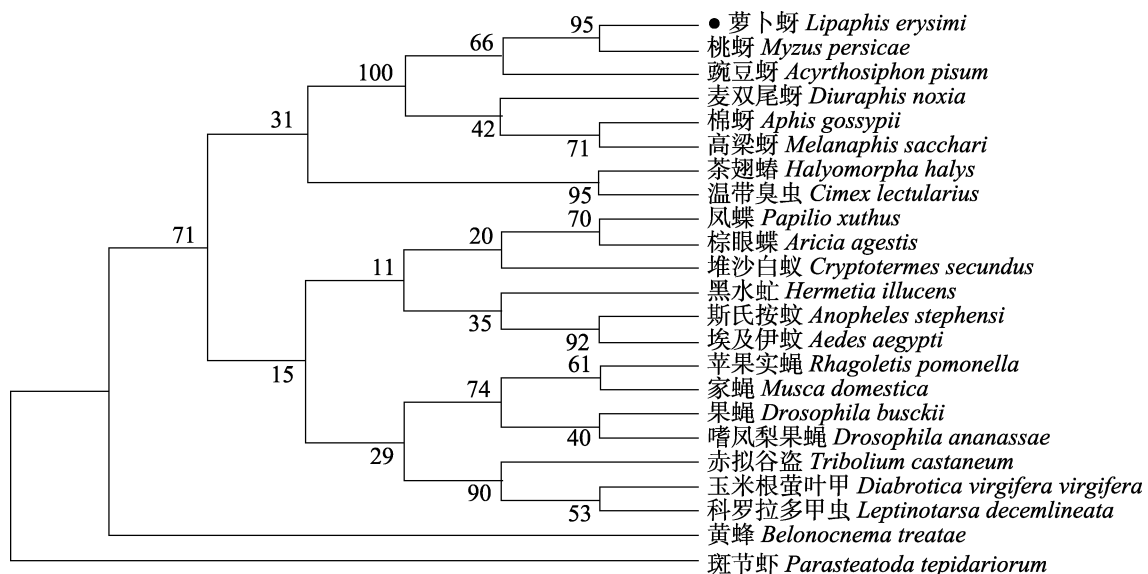


图 2 系统进化树分析 (邻接法, 自展值为 1 000)

Fig. 2 A phylogenetic tree analysis (Neighbour-Joining tree, bootstrap: 1 000)

2.3 *LeATP*f 基因在萝卜蚜不同发育时期的表达谱分析

利用 qRT-PCR 对 *LeATP*f 基因进行表达分析, 结果表明, *LeATP*f 基因在萝卜蚜各发育阶

段均有表达。通过单因素方差分析发现, 2 龄幼虫的 *LeATP*f 基因表达量相对最高, 显著高于其他发育时期 ($P < 0.05$)。而其他发育时期的若虫以及成蚜的表达量相对较低但比较稳定 (图 3)。

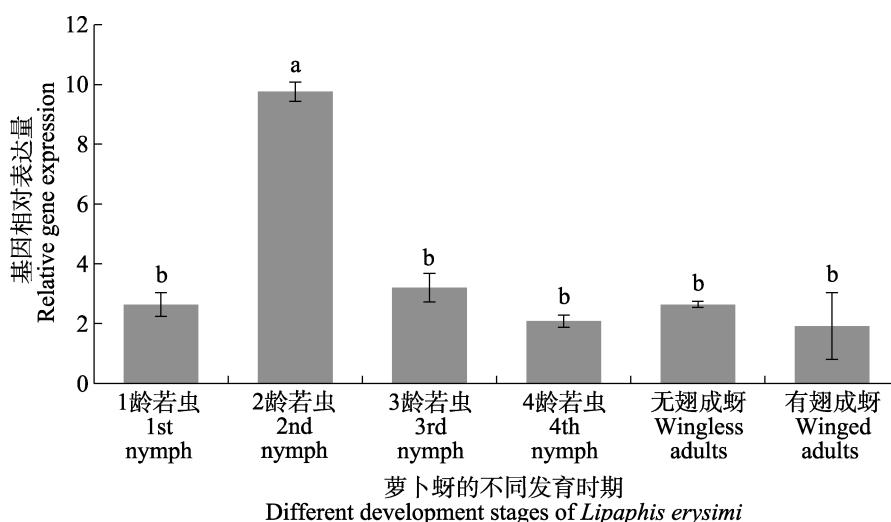


图 3 *LeATP*f 基因在萝卜蚜不同发育时期的基因表达谱分析
Fig. 3 Expression profile analysis of *Lipaphis erysimi* *LeATP*f gene

柱上标有不同小字母表示经方差分析存差异显著 ($P < 0.05$, Tukey's 检验)。下图同。
Histograms with different lowercase letters indicate significant differences by variance analysis ($P < 0.05$, Turkey's test). The same below.

2.4 dsRNA 干扰 *LeATP*f 基因对其表达量的影响

单因素方差分析表明, 喷施 ds*LeATP*f 5 d 后, 萝卜蚜的 *LeATP*f 基因相对表达量显著低于喷施清水和与喷施 dsGFP 组 ($P < 0.05$)。与喷施 dsGFP 的萝卜蚜比较, 喷施 ds*LeATP*f 组的 *LeATP*f 基因相对表达量下降了 76.95% (图 4)。表明 RNA 干扰剂显著抑制了 *LeATP*f 基因的表达。

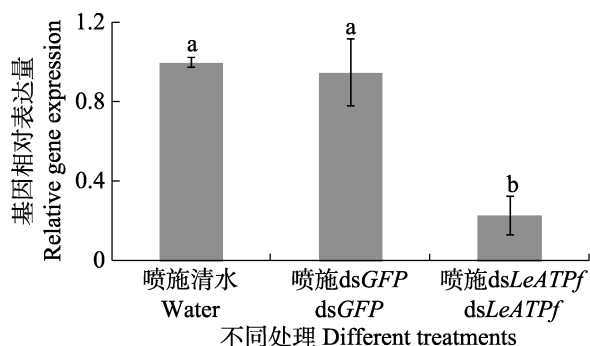


图 4 RNA 干扰对萝卜蚜 *LeATP*f 基因的抑制作用
Fig. 4 Gene repression effect of RNA interference on *LeATP*f gene

2.5 室内施用 ds*LeATP*f 对萝卜蚜的杀虫效果分析

单因素方差分析结果表明, 在处理第 1 和第 3 天, 施用 200.00 mg/L RNA 干扰剂组萝卜蚜的校正死亡率与施用吡虫啉组无显著差异 ($P > 0.05$), 而施用 12.50、25.00、50.00 和 100.00 mg/L 组萝卜蚜的校正死亡率显著低于施用吡虫啉组 ($P < 0.05$)。在处理第 5 天, 施用 100.00 mg/L 和 200.00 mg/L RNA 干扰剂组萝卜蚜的校正死亡率与吡虫啉组无显著差异 ($P > 0.05$), 而施用其他中低浓度 RNA 干扰剂组萝卜蚜的校正死亡率显著低于吡虫啉处理组 ($P < 0.05$)。这表明了高浓度的 RNA 干扰剂 (200.00 mg/L) 对萝卜蚜的杀虫效果与吡虫啉处理组无显著差异 ($P > 0.05$) (表 2)。

2.6 RNA 干扰剂对萝卜蚜的虫口减退率和田间防治效果

对虫口减退率的单因素方差分析结果表明,

在田间施用 *dsLeATP_f* 制剂后 1、3 和 7 d, 喷施 100.00 mg/L 和 200.00 mg/L RNA 干扰剂对萝卜蚜的虫口减退率与吡虫啉处理组均无显著差异 ($P>0.05$); 在药剂处理后第 3、7 d, 喷施 50.00 mg/L RNA 干扰剂组的萝卜蚜虫口减退率与喷施吡虫啉组也无显著差异 ($P>0.05$)。在处理 14 d, 喷施 25.00、50.00、100.00 和 200.00 mg/L RNA 干扰剂组的萝卜蚜虫口减退率均显著高于吡虫啉处理组 ($P<0.05$) (表 3)。对田间防治

效果的单因素方差分析结果表明, 在田间施用 *dsLeATP_f* 后 1、3 和 7 d, 喷施 100.00 mg/L 和 200.00 mg/L RNA 干扰剂对萝卜蚜的防治效果与吡虫啉处理组均无显著差异 ($P>0.05$)。在处理 14 d, 喷施 50.00、100.00 和 200.00 mg/L RNA 干扰剂队萝卜蚜的田间防治效果均显著高于吡虫啉处理组 ($P<0.05$)。这表明高浓度的 RNA 干扰剂与吡虫啉对萝卜蚜的防治相当, 但药效持续性要优于吡虫啉 (表 4)。

表 2 施用 RNA 干扰剂后萝卜蚜的校正死亡率分析
Table 2 The correct mortality of *Lipaphis erysimi* after using dsRNA

RNA 干扰剂 (mg/L) Concentration of RNAi preparation (mg/L)	校正死亡率 (%) Correct mortality (%)		
	药后 1 d	药后 3 d	药后 5 d
	1 day after treatment	3 days after treatment	5 days after treatment
12.50	11.71±4.09d	17.19±3.06d	24.60±2.79c
25.00	13.88±1.78cd	27.43±4.94cd	37.22±7.28bc
50.00	23.62±0.74c	38.49±2.15c	49.90±3.44b
100.00	42.29±3.19b	55.31±2.94b	73.02±5.16a
200.00	48.58±2.15ab	66.31±1.80ab	80.93±1.54a
对照 (70%吡虫啉) Control (70% imidacloprid)	61.14±1.39a	74.36±1.89a	83.29±1.61a

表中数据为平均值±标准误, 同列数据后标有不同小字母表示经方差分析差异显著 ($P<0.05$, Tukey's 检验)。下表同。

Data in the table are mean ± SE, and followed by different small letters in the same line indicate significant differences by variance analysis ($P<0.05$, Tukey's test). The same bellow.

表 3 喷施 RNA 干扰剂对萝卜蚜虫口减退率的影响
Table 3 The population decline rate of *Lipaphis erysimi* after spraying dsRNA in the field

RNA 干扰剂浓度 Concentration of RNAi preparation	虫口减退率 (%) Population decline rate (%)			
	药后 1 d	药后 3 d	药后 7 d	药后 14 d
	1 day after treatment	3 days after treatment	7 days after treatment	14 days after treatment
12.50 mg/L	12.90±0.92c	21.84±2.30c	29.29±2.05b	6.54±4.04bc
25.00 mg/L	15.80±0.93c	35.76±3.90bc	51.98±3.35ab	29.08±2.45abc
50.00 mg/L	36.77±7.37b	53.21±4.44ab	64.67±3.50a	39.32±3.48ab
100.00 mg/L	49.94±0.70ab	54.85±6.35ab	69.44±4.69a	54.07±5.29a
200.00 mg/L	61.26±0.94a	64.07±2.57a	77.44±2.76a	62.72±2.45a
70%吡虫啉 70% Imidacloprid	56.13±2.87a	71.46±3.28a	83.41±5.58a	- 5.05±5.61c
清水 Water	- 12.63±3.93d	- 40.51±6.21d	- 86.22±14.88c	- 117.44±18.34d

表 4 RNA 干扰剂对萝卜蚜的田间防治效果
Table 4 The control effect of RNAi preparation on *Lipaphis erysimi* in the field

RNA 干扰剂浓度 Concentration of RNAi preparation	田间防治效果 (%) Control effect in the field (%)			
	药后 1 d 1 day after treatment	药后 3 d 3 days after treatment	药后 7 d 7 days after treatment	药后 14 d 14 days after treatment
12.50 mg/L	22.49±2.70d	44.24±2.07c	61.69±2.09c	56.70±1.89cd
25.00 mg/L	25.02±3.30cd	54.33± 1.21bc	74.17±0.29bc	66.70±4.11bcd
50.00 mg/L	42.90±6.36bc	66.80±1.96ab	80.84±2.11ab	71.65±3.11abc
100.00 mg/L	49.94±0.70ab	67.39±5.83ab	82.97±3.95ab	78.75±2.18ab
200.00 mg/L	56.72±4.32ab	74.27±2.54a	87.62±2.18a	82.49±2.31a
70%吡虫啉 70% Imidacloprid	61.07±1.87a	79.66±2.36a	91.39±2.62a	50.97±5.10d

3 讨论

RNAi 被认为是一种有效的、物种特异性的基因害虫防治技术 (Price and Gatehouse, 2008; Huvenne and Smagghe, 2010)。作为一种新型绿色高效的害虫防治新技术, RNA 杀虫剂与落实化学农药减施增效和绿色可持续发展的理念完全契合 (胡少茹等, 2019)。RNA 干扰剂的使用可以通过喷洒、灌根、树干注射和种子包衣等方法 (Ma *et al.*, 2020)。叶超 (2019) 通过点滴法将 dsRNA 通过体壁渗透到豌豆蚜 *Acyrtosiphon pisum* 体内, 发现豌豆蚜的乙酰胆碱酯酶基因 *ApAChE*、唾液蛋白基因 *ApC002*、几丁质合成酶基因 *ApCHS* 和保幼激素结合蛋白基因 *ApJHBP* 等多个基因的表达均被显著抑制 (41.0%-99.7%)。Zheng 等 (2019) 在大豆蚜上建立了一种纳米材料介导的 dsRNA 体壁渗透系统, 通过干扰关键基因表达, 起到了很好的害虫防治效果。Yan 等 (2020a, 2021) 利用一种成本低廉的星状阳离子聚合物作为高效的基因载体制备了 2 种 dsRNA 纳米粒制剂, 直接喷洒到受蚜虫侵害的大豆幼苗上, 室内条件下对大豆蚜的致死率分别达 78.50% 和 75.22%。Gong 等 (2013) 利用 6 个 siRNA 靶向小菜蛾 *Plutella xylostella* 的乙酰胆碱酯酶基因, 以喷施 siRNA 的植物叶片饲喂小菜蛾 2 龄幼虫, 杀虫率达到 89%, 具有良好的控制效果。这与本研究中针对萝卜蚜基因合成的双链 RNA 制剂 (高浓度) 的防治效果 (田间

防效达到 80% 以上) 接近, 表明了萝卜蚜 *LeATP*f 基因是一个具备应用潜力的 RNAi 生物农药的靶标基因。

ATP 合成酶是线粒体能量守恒中的关键酶 (Hong and Pedersen, 2008), 其广泛分布于生物体的线粒体内膜等质膜上, 利用电子流的动力由 ADP 和无机磷酸盐合成 ATP, 为生物体提供能量 (赵婷等, 2014)。目前, 对于微生物和植物 ATP 合成酶的研究已经较多, 但对于昆虫 ATP 合成酶的研究还较少 (Younis *et al.*, 2011)。本研究采用 RT-PCR 技术成功克隆了该基因全长 324 bp, 编码 107 个氨基酸的萝卜蚜 ATP 合成酶 f 亚基基因 *LeATP*f。由于 ATP 合成酶基因在生物体能量代谢及生长发育等过程中发挥非常重要的作用, 因此其非常符合 RNAi 生物农药筛选靶标基因的特性。萝卜蚜 *LeATP*f 基因是一个典型的 ATP 合成酶基因, 在不同物种间具有高度的同源性, 从序列比对以及系统发育树可以看出, 该基因与半翅目蚜科其他 5 种蚜虫的序列一致性均在 88% 以上, 且能通过很好的聚集在一个分支之中, 同时与半翅目其它昆虫聚集在一个大支上。通过基因表达可以看出, 该基因在萝卜蚜各个龄期均有表达, 是一个全周期表达的基因, 这一特点非常有利于 RNAi 生物农药的靶标开发。

高效低成本是 RNA 生物农药推广应用的关键问题。基因载体的高经济成本限制了其开发和应用, 因此, RNAi 技术在害虫防治领域的应用中迫切需要开发低成本特别是大规模应用的高效基因载体。Li 等 (2019) 通过合成了一种高效、

低成本的基因载体——星状阳离子聚合物，将 dsRNA 的生产成本降低到 1.7 美元/g；美国的 Greenlight 公司通过无细胞合成体系，将 dsRNA 的合成成本控制在 0.5 美元/g 以内，其成本已经完全能够满足田间规模化应用的要求（Taning *et al.*, 2019）；今年以来，我国的科学家通过细菌表达系统和纳米载体将 dsRNA 的合成成本控制在 0.47 美元/g（Ma *et al.*, 2022），更是进一步降低了 RNA 干扰剂的成本。本研究中合成的针对萝卜蚜的 dsRNA 成本仍然高于 1 美元/g，通过借鉴最新的合成技术，可以进一步将合成萝卜蚜 RNA 干扰剂的成本降低，从而实现大规模的田间推广和应用。

本研究克隆了萝卜蚜的 *LeATP*f 基因，并利用 RNA 干扰技术抑制了该基因表达，发现喷施 RNA 干扰剂可有效抑制其表达，表明其可以作为 RNAi 生物农药的靶标基因。通过分析复配 RNA 干扰剂对萝卜蚜的田间防治效果，发现中高浓度的 RNA 干扰剂对萝卜蚜的防治效果与吡虫啉相当，但是其药效持续性优于吡虫啉。综上所述，*LeATP*f 基因是开发萝卜蚜 RNA 干扰剂的良好靶标基因，可用于田间萝卜蚜的绿色高效防控。

参考文献 (References)

Adachi-Hagimori T, Shibao M, Tanaka H, Seko T, Miura K, 2011. Control of *Myzus persicae* and *Lipaphis erysimi* (Hemiptera: Aphididae) by adults and larvae of a flightless strain of *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae) on non-heading brassica cultivars in the greenhouse. *Biocontrol*, 56(2): 207–213.

Elston T, Wang H, Oster G, 1998. Energy transduction in ATP synthase. *Nature*, 391(6666): 510–513.

Gong L, Chen Y, Hu Z, Hu M, Turgay U, 2013. Testing insecticidal activity of novel chemically synthesized siRNA against *Plutella xylostella* under laboratory and field conditions. *PLoS ONE*, 8(5): e62990.

Guan RB, Li HC, Miao XX, 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.

Hong S, Pedersen PL, 2008. ATP synthase and the actions of inhibitors utilized to study its roles in human health, disease, and other scientific areas. *Microbiology and Molecular Biology*

Reviews, 72(4): 590–641.

Huvenne H, Smaghe G, 2010. Mechanisms of dsRNA uptake in insects and potential of RNAi for pest control: A review. *Journal of Insect Physiology*, 56(3): 227–235.

Hu LL, Liu Y, Xu HF, Zhi LS, 2004. Intra- and interspecific relationship of *Myzus persicae* (Sulzer) and *Lipaphis erysimi* (Kaltenbach) on cabbage. *Entomological Journal of East China*, 13(1): 77–80. [胡玲玲, 刘勇, 徐洪福, 郅伦山, 2004. 桃蚜、萝卜蚜的种内密度和种间竞争效应. 华东昆虫学报, 13(1): 77–80.]

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.]

Ji XL, Liu CQ, Hu LL, Liu Y, 2019. Mutual damages mediate host nitrogen nutrition and interspecific competition between *Myzus persicae* and *Lipaphis erysimi*. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 35(4): 97–101. [纪祥龙, 刘长庆, 胡玲玲, 刘勇, 2019. 桃蚜与萝卜蚜交互为害对寄主氮营养及蚜虫种间竞争的调节. 中国农学通报, 35(4): 97–101.]

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.

Livak KJ, Schmittgen TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-delta delta c(t)) method. *Methods*, 25(4): 402–408.

Ma ZZ, Zhang YH, Li MS, Chao ZJ, Du XG, Yan S, Shen J, 2022. A first greenhouse application of bacteria-expressed and nanocarrier-delivered RNA pesticide for *Myzus persicae* control. *Journal of Pest Science*, doi: org/10.1007/s10340-022-01485-5.

Ma ZZ, Zhou H, Wei YL, Yan S, Shen J, 2020. A novel plasmid-*Escherichia coli* system produces large batch dsRNAs for insect gene silencing. *Pest Management Science*, 76(7): 2505–2512.

Ma ZZ, Yan S, Shen J, 2019. An efficient dsRNA production method based on engineering bacteria for targeted insect genes. *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.]

Mehlhorn S, Hunnekuhl VS, Geibel S, Nauen R, Bucher G, 2021. Establishing RNAi for basic research and pest control and identification of the most efficient target genes for pest control: a brief guide. *Frontiers in Zoology*, 18(1): 60–76.

Mysore K, Li P, Wang CW, HapairaimLK, Scheel ND, Realey JS, Sun LH, Severson DW, Wei N, Duman-Scheel M, 2019. Characterization of a broad-based mosquito yeast interfering RNA larvicide with a conserved target site in mosquito

- semaphorin-1a genes. *Parasites and Vectors*, 12(1): 256–270.
- Price DR, Gatehouse JA, 2008. RNAi-mediated crop protection against insects. *Trends Biotechnol*, 26(7): 393–400.
- Senior AE, Nadanaciva S, Weber J, 2002. The molecular mechanism of ATP synthesis by F1F0-ATP synthase. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1553(3): 188–211.
- Shi XK, Zhang YW, Zhu KY, Ma EB, Zhang JZ, Liu XJ, Wu HH, 2017. Comparison of the efficacy of different dsRNA delivery methods to silence antenna-rich genes in *Locusta migratoria*. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 54(5): 780–790. [史学凯, 张艺伟, 朱坤炎, 马恩波, 张建珍, 刘晓健, 吴海花, 2017. 不同 RNAi 方法对飞蝗触角高表达基因沉默效率的比较. 应用昆虫学报, 54(5): 780–790.]
- Song WH, Lin CY, Li Y, Li HY, Liu CZ, 2020. Indoor toxicity of nine insecticides to *Myzus persicae* on potato was determined. *Modern Agrochemicals*, 19(2): 49–51. [宋维虎, 林春燕, 李叶, 李鸿雁, 刘长仲, 2020. 9 种杀虫剂对马铃薯桃蚜的室内毒力测定. 现代农药, 19(2): 49–51.]
- Spikes TE, Montgomery MG, Walker JE, 2020. Structure of the dimeric ATP synthase from bovine mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(38): 23519.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S, 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony method. *Molecular Biology and Evolution*, 28(10): 2731–2739.
- Taning CN, Arpaia S, Christiaens O, Dietz Pfeilstetter A, Jones H, Mezzetti B, Sabbadini S, Sorteberg HG, Sweet J, Ventura V, Smagghe G, 2019. RNA-based biocontrol compounds: Current status and perspectives to reach the market. *Pest Management Science*, 76(3): 841–845.
- Tian HG, Liu TX, Zhang WQ, 2013. RNAi technology and method in insects. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 50(5): 1453–1457. [田宏刚, 刘同先, 张文庆, 2013. 昆虫 RNAi 技术与方法. 应用昆虫学报, 50(5): 1453–1457.]
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG, 1997. The CLUSTAL-X windows interface: Exible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 25(24): 4876–4882.
- Wang F, Zheng PF, Nong XQ, Wang GJ, Cao GC, Zhang ZH, 2017. Synergistic effect of *beauveria bassiana* and three pesticides on *Lipaphis erysimi*. *Chinese Journal of Biological Control*, 33(6): 752–759. [王峰, 郑鹏飞, 农向群, 王广君, 曹广春, 张泽华, 2017. 球孢白僵菌与三种农药对萝卜蚜的协同防治效果. 中国生物防治学报, 33(6): 752–759.]
- Wang YB, Zhang H, Li HC, Miao XX, 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.
- Yan S, Qian J, Cai C, Ma ZZ, Li JH, Yin M, Ren B, Shen J, 2020a. 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 B, Zeng B, Shen J, 2020b. Improving RNAi efficiency for pest control in crop species. *Biotechniques*, 68(5): 283–290.
- Yan S, Ren B, Shen J, 2021. Nanoparticle-mediated double-stranded RNA delivery system: A promising approach for sustainable pest management. *Insect Science*, 28(1): 21–34.
- Yang YH, Yang HR, Yang LQ, Shen J, Yan S, 2021. Research progress of RNA insecticides. *China Plant Protection*, 41(3): 25–29. [杨雨姮, 杨华蕊, 杨柳青, 沈杰, 闫硕, 2021. RNA 杀虫剂的研究进展. 中国植保导刊, 41(3): 25–29.]
- Ye C, 2019. Topical application and injection based RNAi efficiency in *Acyrtosiphon pisum* and the mechanism of dsRNA uptake. Doctoral dissertation. Chongqing: Southwest University. [叶超, 2019. 豌豆蚜点滴与注射法递送 dsRNA 介导的 RNAi 效率及其摄取机制研究. 博士学位论文. 重庆: 西南大学.]
- Younis HM, Serrano R, Reda K, 2011. The insecticide DDT targets the OSCP and subunit D of the *Apis mellifera* ATP synthase. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 43(5): 457–463.
- Zhao T, Niu C, Ruan TT, Nan J, Cong WT, Jin LT, 2014. Post-translational modification of ATP synthase. *Pharmaceutical Biotechnology*, 21(1): 91–94. [赵婷, 牛超, 阮丹丹, 南佳, 丛维涛, 金利泰, 2014. ATP 合成酶的翻译后修饰. 药物生物技术, 21(1): 91–94.]
- Zhang H, Li HC, Miao XX, 2013. Feasibility, limitation and possible solutions of RNAi-based technology for insect pest control. *Insect Science*, 20(1): 15–30.
- Zhang QY, Li Z, Zhang HJ, Wang XP, Zhu ZH, 2019. Transcriptomic analysis of winged and wingless *Lipaphis erysimi* (Kaltenbach). *Journal of Huazhong Agricultural University*, 38(4): 40–44. [张秋圆, 李昭, 张慧杰, 王小平, 朱智慧, 2019. 萝卜蚜有翅型和无翅型转录组差异分析. 华中农业大学学报, 38(4): 40–44.]
- Zhang XZ, Zhang HJ, Zhou YC, Li Z, Wang HY, Zhu ZH, 2020. Identification and expression of TERT in *Lipaphis erysimi* (Kaltenbach). *Journal of Huazhong Agricultural University*, 39(6): 8–14. [张鑫泽, 张慧杰, 周义成, 李昭, 王赫远, 朱智慧, 2020. 萝卜蚜端粒逆转录酶 TERT 基因的鉴定与表达分析. 华中农业大学学报, 39(6): 8–14.]
- Zheng Y, Hu Y, Yan S, Zhou H, Song DL, Yin MZ, 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.