

◆ 综述与专论 ◆

RNAi技术在昆虫防控研究中的应用和发展前景

李晨雨,裴新国,张伊杰,高聪芬*

(南京农业大学植物保护学院 绿色农药创制与应用技术国家地方联合工程研究中心,南京 210095)

摘要:随着昆虫分子生物学技术的蓬勃发展, RNA干扰(RNAi)作为21世纪以来的变革性技术,通过特异性抑制靶基因转录后水平的表达,在昆虫基因功能研究方面被广泛应用。由于沉默重要基因的表达会导致某些昆虫的死亡或行为缺陷,故该技术被认为是一种潜在的害虫防治策略,在控制、研究甚至保护昆虫方面具有巨大潜力,目前已被广泛应用于半翅目、直翅目、双翅目等昆虫。RNAi是昆虫学研究和害虫控制潜在应用的流行和重要的反向遗传学策略。从RNAi技术的原理、导入方法、效率影响因素及在农业害虫中的应用研究实例等4方面进行了综述,并对其防控应用和发展前景进行了展望。

关键词: RNAi 技术;昆虫;基因沉默;dsRNA;导入方法;害虫防控;效率影响因素;脱靶效应

中图分类号:S 433 文献标志码:A doi:10.3969/j.issn.1671-5284.2021.01.001

Application and Development Prospect of RNAi Technology in Pest Control

LI Chenyu, PEI Xinguo, ZHANG Yijie, GAO Congfen*

(College of Plant Protection, Nanjing Agricultural University, State and Local Joint Engineering Research Center of Green Pesticide Invention and Application, Nanjing 210095, China)

Abstract: Along with the vigorous development of insect molecular biology technology, RNA interference(RNAi), as a transformative technology since the 21st century, is necessary in the study of insect gene function by specific inhibition of the expression of the target gene transcription level. Silencing important gene expression will lead to the death or behavioral defect of some insects, so the technology is considered as a potential pest control strategy. Besides, RNAi technology has great potential in insect control, research, and protection, and they have been widely applied in the Hemiptera, Orthoptera, Diptera insects, etc. RNAi is a popular and important reverse genetic strategy for entomological research and potential applications of pest control. In this paper, the principle, import method, efficiency influencing factors, application research examples of RNAi technology in agricultural pests and development prospects are reviewed.

Key words: RNAi technology; insect; gene silencing; dsRNA; import method; pest control; efficiency influencing factors; off-target effects

从基因角度对害虫进行防控是一种新视角,其可以解决一些杀虫剂所无法触及的问题。CRISPR-Cas9作为第3代基因编辑技术,是当今生命科学领域的热点,但它仍处于高度实验的阶段,使用价格高且还有许多未知的风险。RNA干扰(RNA interference, RNAi)技术作为一种存在于真核细胞中的基因调控机制,能引发特定基因的转录后

沉默,具有特异性、高效性、位置效应、ATP依赖性和可传播性等特点^[1],在病虫害防治中展现出巨大的潜力,且因其不易与其他杀虫剂产生交互抗性,因此成为一种新兴的害虫防控策略^[2-3]。

关于RNAi最早的报道是1990年Napoli等^[4]在牵牛花中发现的共抑制现象。他通过注射植物花色的相关基因到牵牛花中,使原本鲜艳的花色变得白皙;

收稿日期:2020-07-06

基金项目:国家自然科学基金(31471804)

作者简介:李晨雨(1997—),男,山东淄博人,硕士研究生,研究方向为杀虫剂毒理与抗药性研究。E-mail: luckyrain1997@163.com

通信作者:高聪芬(1970—),女,河北石家庄人,博士,教授,主要从事杀虫剂毒理与抗药性研究。E-mail: gaocongfen@njau.edu.cn

比较基因的表达含量时发现,转基因花比正常花浓度低了50倍,原因在于导入的基因和内源基因表达均被抑制,且该抑制是发生在转录后,故又称为转录后基因沉默。Fire等^[5]于1998年首先证实了RNAi现象,通过向秀丽隐杆线虫中注射dsRNA后发现,其对基因有极高的抑制作用,揭示了基因沉默的本质,即dsRNA能有效地降低目标基因的表达活性,并将这一现象命名为RNAi。目前,随着RNAi技术的日趋成熟,越来越多的试验证实RNAi现象几乎在所有真核生物中都有发现,包括原生动物、无脊椎动物、脊椎动物、真菌、藻类和植物^[6-7]。美国国家医学图书馆(PubMed)上以“insect”和“RNAi”作为关键词搜索发现,2000年以来昆虫RNAi研究领域共有4 580个相关的报道数据结果,近10年来所发表文章数约占数据结果的75%,总体呈逐年增多的趋势,说明针对该研究领域进行昆虫的防控和相应靶标药剂的研发正在快速发展,且越来越受到人们的重视。

笔者主要论述RNAi技术在昆虫防控研究中的应用和发展前景,从RNAi技术的原理、导入方法、效率及其在农业害虫中的应用研究实例等4个方面进行了综述,旨在介绍其潜在的害虫防治应用前景。

1 RNAi的原理

RNAi存在于真核生物中,是一种强大的基因功能研究技术。RNAi的作用过程大致可分为3个阶段,分别是起始阶段、效应阶段和扩增阶段^[8]。

起始阶段:来自内源或体外合成的dsRNA被转移进入宿主细胞内与细胞内Dicer酶作用后,被剪切成21~25 bp的小干扰RNA(small interfering RNA, siRNA)。

效应阶段:siRNA在宿主细胞中被细胞内解旋酶解旋成两条单链,其反义链(引导链)在细胞质内结合一个核酶复合物,形成RNA诱导的沉默复合物,通过碱基互补配对原则特异性识别细胞内信使RNA(mRNA),由核酸内切酶将靶标mRNA降解,使该mRNA表达量下降,从而促使靶标基因沉默,细胞内该基因功能丧失^[9]。

扩增阶段:又称信号级联放大阶段,即siRNA与靶序列mRNA结合后,以siRNA作为引物,RNA聚合酶催化合成新的dsRNA模板,之后重复前两个阶段,使RNA沉默作用不断放大。

2 RNAi在昆虫体内的导入方法

如何将dsRNA导入昆虫体内在很大程度上影响

着昆虫RNAi的效果,同时在有害生物的防控应用中也是极其关键的一环。目前,RNAi导入的主要方法有注射、浸泡、饲喂,以及在此基础上衍生出来的转基因植物介导、纳米粒子包被、脂质体修饰、病毒感染、共生体介导等。

注射法是目前研究昆虫基因功能最常用的方法。该方法将dsRNA或siRNA在适当的溶液中通过注射针插入昆虫的胚胎或虫体的特定部位,避开肠道直接到达血淋巴和相应组织,可实现快速准确到达作用部位,避开结构障碍。由于注射条件的限制,该方法目前只能应用于室内昆虫基因功能研究,无法大规模应用于田间害虫防治。

浸泡法,也称为细胞外RNAi,一般是针对昆虫细胞株,将昆虫细胞直接浸泡在dsRNA的溶液里,诱导产生RNAi现象。该方法在适宜的培养液浓度、温度、时间等前提条件下,具有转染速度快、周期短的优点。

饲喂法是给昆虫饲喂含有人工合成或微生物体内合成dsRNA的食物,通过口器取食进入虫体的一种导入方法。与注射法相比,该方法没有机械损伤,实际应用更方便,已在鞘翅目昆虫中取得较好效果,可用于高通量靶标基因筛选和大田推广^[10],但在鳞翅目昆虫中效果差。昆虫体内的RNAi现象存在剂量限制,需要不断地饲喂dsRNA才能使之产生持续RNAi现象,因此需要对剂量浓度和饲喂时间进行把控。有研究^[11]报道,针对亚洲柑橘木虱,通过将2种及2种以上针对不同靶标基因的融合dsRNA被饲喂进入昆虫体内实现共沉默是一种很好的RNAi策略,可推广应用于害虫防控。

转基因植物法,即植物介导的昆虫RNAi,是指将昆虫靶标基因的dsRNA表达在植物体中,昆虫取食后生长发育受阻,存活率和繁殖力下降,甚至影响子代生长发育。目前,在小麦、水稻、玉米、棉花、烟草、马铃薯、拟南芥等植物中有所应用,主要针对咀嚼式和刺吸式口器昆虫,如鳞翅目幼虫、鞘翅目和同翅目害虫^[7]。将昆虫保幼激素RNAi抗虫棉和RNAi+Bt的聚合棉共同应用可大大延缓棉铃虫对单一影响策略的抗性^[12]。以上方法的关键是获得含有昆虫靶标基因的转基因植物。

纳米粒子包被和脂质体修饰这2种新型导入方法,会更加有效地提高dsRNA的稳定性,促进中肠吸收,提高RNAi的效率,进而促进昆虫RNAi研究和害虫防治应用。纳米粒子作为分子载体,通过静电作用与dsRNA结合,促进肠上皮细胞的胞内传递,保护

dsRNA不受核酸酶和极端pH环境的影响。纳米粒子具有低毒性,可以被细胞高效吸收。纳米粒子系统进入昆虫体内后dsRNA的解离至关重要,它与dsRNA的聚合比例决定Dicer酶作用于dsRNA的能力,因此良好的配比是成功进行RNAi的关键。目前,碳量子点、鸟苷酸聚合物、支链两性多肽胶囊(BAPC)等已成功用于促进昆虫dsRNA摄取的纳米粒子系统^[13-14]。脂质体修饰是利用带正电荷的脂质体与带负电荷的dsRNA通过静电作用结合,协助dsRNA的经口转运和昆虫细胞培养中的传递,具有极好的生物相容性,但在哺乳动物细胞中应用该方法会产生免疫反应,抑制某些酶的活性^[15]。

病毒感染法和共生体介导法均是通过以转基因微生物为基础生产dsRNA,再通过取食、体壁侵入或韧皮部共生等多种途径导入昆虫体内。病毒感染法,即病毒诱导的基因沉默,是将靶标基因dsRNA通过病毒侵染途径导入宿主体内。此外,RNAi参与抵抗病毒的免疫反应,有3种小分子RNA(小干扰RNA、微小RNA和Piwi蛋白)相互作用,例如,在蚊虫体内发挥抗蚊媒病毒的免疫作用^[16]。研究抗病毒的RNAi途径,抑制病毒在媒介昆虫中的复制以及在益虫(如蜜蜂和家蚕)中利用对非靶标生物安全的病

毒序列启动抗病毒RNAi反应,对防止感染高致病性病毒和开发基于病毒基因的特异性杀虫剂具有重要意义。物种特有的兼性肠道共生菌比常规微生物饲喂沉默效果好,具有宿主特异性。共生体介导法通过构建缺乏RNase 编码基因来避免dsRNA在微生物体内提前被降解,可以使肠道中dsRNA持续表达,能观察到各个时期的表型变化。该方法成功的前提是昆虫具有可培养的共生体。

3 农业害虫的RNAi应用研究

结合上述dsRNA导入方法,对近几年农业害虫(包括鞘翅目、半翅目、鳞翅目等常见的多种害虫)的RNAi应用研究实例进行整理,结果见表1。其中大部分农业害虫在特定靶基因的沉默之后,产生死亡表型,具有RNAi田间广泛应用的潜力,为核酸农药生产提供参考。目前农业害虫的田间实际应用防治主要是通过饲喂法以及在饲喂法基础上建立起来的新型dsRNA导入方法,其中以玉米为主要应用作物的转基因植物法已经得到美国、巴西和日本等8个国家和地区的安全性评价,并在2017年6月获得了美国环境署的种植许可^[17],相信在未来发展中会得到更广阔的应用前景。

表1 农业害虫 RNAi 应用研究实例

所属目	昆虫	靶标基因	导入方式	效应	参考文献
鞘翅目	甘薯象甲	蛋白酶体	饲喂	死亡	[18]
	玉米根甲虫	膜泡分拣蛋白	转基因植物	死亡	[19]
		展翅基因	饲喂	抑制羽化	[20]
	马铃薯甲虫	P450酶	饲喂	幼虫死亡	[21]
	赤拟谷盗	免疫球蛋白重链结合蛋白	纳米粒子包被	抑制羽化	[22]
半翅目	蚜虫	表皮蛋白	饲喂	虫体失水、死亡	[23]
	大豆蚜虫	血淋巴	纳米粒子	抑制种群数量	[24]
	柑橘木虱	蔗糖水解酶	饲喂	死亡、成虫腹水	[25]
		谷胱甘肽S转移酶	人工饲料	解毒能力下降	[11]
	褐飞虱	几丁质合成酶A	人工饲料	死亡	[26]
	烟粉虱	液泡膜ATP酶	转基因植物	死亡、抑制繁殖	[27]
		类钟形受体	人工饲料	降低免疫力	[28]
	茶翅蟥	凋亡抑制蛋白	饲喂	死亡	[29]
	桃蚜	辅助成分-蛋白酶	浸叶法	死亡	[30]
	鳞翅目	玉米螟	糜蛋白酶	饲喂	死亡
甜菜夜蛾		几丁质合成酶A	微生物饲喂	死亡	[32]
棉铃虫		保幼激素	病毒感染	死亡	[33]
小菜蛾		ABC转运蛋白	饲喂	幼虫和蛹死亡	[34]
		酪氨酸羟化酶	饲喂	幼虫死亡	[35]
	草地贪夜蛾	液泡膜ATP酶	纳米粒子	击倒、死亡	[36]
等翅目	台湾乳白蚁	内切葡聚糖酶	注射、饲喂	死亡、体重下降	[37]
纓翅目	西花蓟马	类钟形受体	饲喂	死亡	[38]
蜱螨目	二斑叶螨	外壳蛋白亚基	饲喂	死亡	[39]
	柑橘红蜘蛛	保幼激素受体	转基因植物	死亡	[40]

4 RNAi效率的影响因素和脱靶效应

4.1 影响因素

昆虫RNAi技术的应用在基因功能研究和害虫防控上获得了长足的进展,但沉默效率的多样性正制约着该技术的进一步提升。注射法可以将dsRNA高效地导入昆虫体内引起沉默反应,然而针对大多数鞘翅目和鳞翅目昆虫,同样采用饲喂法喂食dsRNA,前者沉默效率在100%左右,而后者却对RNAi现象不敏感,效率甚至低于50%^[41]。究其原因,影响RNAi效率的因素主要有以下几方面:昆虫肠道环境、靶标基因的选择、dsRNA的剪切形式和长度。

4.1.1 昆虫肠道环境

昆虫肠道内的消化核酸酶、过碱性pH条件、肠道微生物和围食膜基质是影响dsRNA稳定的因素,同时也直接关乎RNAi的效率^[10]。通过饲喂法导入dsRNA最大的问题就是肠道内的核酸酶和肠道pH环境对dsRNA有强降解作用,破坏基因沉默的初始信号^[42]。例如,在东亚飞蝗肠道中,dRNase2对dsRNA的快速降解是导致口服dsRNA时RNAi效率低下的重要因素^[43]。肠道微生物影响肠道的pH值,并分泌可降解dsRNA或干扰肠道细胞摄取的核酸酶。由几丁质和带负电荷的糖蛋白组成的围食膜基质可能会阻止dsRNA有效地进入肠上皮细胞,且膜孔的大小影响dsRNA传递。

4.1.2 靶标基因的选择

RNAi技术成功应用的重点是通过高通量筛选和基因功能验证确定害虫高致死性的靶标基因,从而进一步判断是否可作为害虫防控的RNAi靶点。首先,昆虫在细胞和组织水平上是通过受体介导的内吞作用摄取dsRNA,所以与细胞膜运输相关的基因靶点似乎是一些最致命的昆虫RNAi靶点^[44]。其次,在幼虫和成虫发育时期的关键基因可以作为致死基因。卵期和蛹期昆虫处于表面静止状态,无法取食dsRNA,之后昆虫将进入活动性强的幼虫期或成虫期,发生取食危害,筛选卵期和蛹期关键致死基因对于害虫防治至关重要,如沉默与褐飞虱蜕皮相关的*NIRan*基因后,褐飞虱因蜕皮困难致死,雌虫繁殖能力受到影响^[45]。

4.1.3 dsRNA的剪切形式及长度

Dicer酶对dsRNA进行剪切是整个RNAi过程的关键步骤,不同物种昆虫dsRNA的剪切形式是RNAi效率不同的原因之一^[46]。有研究^[47]发现,dsRNA的剪切偏好性位点在鞘翅目中呈现多样性,而在鳞翅目

昆虫中Dicer酶的剪切偏好位点是GGU,这可能是导致在两种目中RNAi效率存在较大差异的原因,也可能是导致物种间RNAi效率不同的原因。此外,dsRNA的长度也影响RNAi效率。赤拟谷盗中发现只有大于31 bp的小分子RNA才能诱导RNAi产生^[48];植物介导昆虫RNAi防治害虫的靶标基因dsRNA长度应大于60 bp,且在一定范围内长度越长,RNAi效率越高^[49]。

4.2 脱靶效应

基因沉默的准确性是由siRNA参与介导的,siRNA引导的基因沉默不仅可以和靶标基因结合,由于导入片段的特异性不强,也可以和非靶标基因结合导致基因沉默,这种现象称为脱靶效应^[50]。目前基因编辑技术的应用都会存在脱靶效应的风险,使得靶标基因表达水平没有发生显著变化。导致脱靶效应产生的因素有很多,当dsRNA与mRNA的匹配长度超过相应碱基对后就会产生较高的脱靶效应。在黑腹果蝇和秀丽隐杆线虫的研究中发现,前者匹配长度超过19 bp后会产生较高的假阳性结果,而后者则在超过40 bp且相似性高于95%时会出现脱靶效应^[45]。如果将设计的dsRNA针对的mRNA序列与其他基因比对分析后没有发现连续19 bp的碱基完全相同,则基本就可以保证特异的对靶标基因进行沉默。此外,RNAi脱靶效应的产生与siRNA/dsRNA的浓度有关。设计适宜浓度的混合siRNA/dsRNA进行干扰比单一转染的siRNA或者dsRNA更能降低脱靶效应^[10]。现有研究^[44]表明,如果针对同一基因的不同区域设计多种dsRNA,则可以有效避免脱靶效应。

田间脱靶效应的出现会使靶标生物的非靶标基因沉默,也可能会导致其他非靶标生物甚至有益生物基因沉默,从而产生一系列潜在的安全性问题,如Bachman等^[51]报道了玉米根萤叶甲的*Snf7*基因dsRNA对不同昆虫的脱靶效应。然而,正确地运用脱靶效应的原理,通过比较不同生物基因组序列,选择有害生物物种间保守而有益生物同源性低的序列作为靶标基因,可在昆虫防控研究应用上将植物介导的昆虫RNAi和核酸农药设计得更广谱和安全。

5 结语与展望

RNAi技术作为21世纪的变革性技术,不但在研究昆虫不同发育阶段的基因功能上发挥了重要作用,而且RNAi技术也为害虫防治提供了极具潜力的特异性杀虫剂研发新思路。目前,孟山都公司预计2020年上市基于RNAi开发的防控农业害虫和病毒的核酸农药产品^[52]。虽然该项技术直接用于害虫防

治还存在制造成本高、易受环境影响等因素限制,但相信随着昆虫分子生物学研究的不断深入, RNAi技术在昆虫防控研究中的应用也会更加广泛。合成 dsRNA效率的提高、核酸生物农药的研发和应用成本的降低,终将会促使其从实验室走向田间,推动植物保护技术取得更大发展。

参考文献

- [1] 王伟伟,刘妮,陆沁,等. RNAi技术的最新研究进展[J]. 生物技术通报, 2017, 33(11): 35-40.
- [2] ANDRADE E C D, HUNTER W B. RNA interference-natural gene-based technology for highly specific pest control (hispec)[J]. RNA Interference, 2016, 19: 391-409.
- [3] CAGLIARI D, DIAS N P, GALDEANO D M, et al. Management of pest insects and plant diseases by non-transformative RNAi[J]. Frontiers in Plant Science, 2019, 10: 1319.
- [4] NAPOLI C, LEMIEUX C, JORGENSEN R. Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans[J]. The Plant Cell, 1990, 2(4): 279-289.
- [5] FIRE A, XU S, MONTGOMERY M K, et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in caenorhabditis elegans[J]. Nature, 1998, 391(6669): 806-811.
- [6] ZHU K Y, PALLI S R. Mechanisms, applications, and challenges of insect RNA interference[J]. Annual Review Entomology, 2020, 65: 293-311.
- [7] SIJEN T, FLEENOR J, SIMMER F, et al. On the role of RNA amplification in dsRNA-triggered gene silencing[J]. Cell, 2001, 107(4): 465-476.
- [8] TOMARI Y, ZAMORE P O. Perspective: machines for RNAi[J]. Genes and Development, 2005, 19(5): 517-529.
- [9] TIJSTERMAN M, PLASTERK R H A. Dicers at RISC: the mechanism of RNAi[J]. Cell, 2004, 117(1): 1-3.
- [10] KUNTE N, MCGRAW E, BELL S, et al. Prospects, challenges and current status of RNAi through insect feeding[J]. Pest Management Science, 2020, 76(1): 26-41.
- [11] YU X D, KILLINY N. RNA interference of two glutathione S-transferase genes, *Diaphorina citri* *DcGSTe2* and *DcGSTdl*, increases the susceptibility of Asian citrus psyllid (Hemiptera: Liviidae) to the pesticides fenprothrin and thiamethoxam[J]. Pest Management Science, 2018, 74(3): 638-647.
- [12] 刘刚. 植物RNAi抗虫研究取得新进展 [J]. 农药市场信息, 2017 (9): 51.
- [13] OLIVIER C, TARDAJOS M G, MARTINEZ R Z L, et al. Increased RNAi efficacy in *Spodoptera exigua* via the formulation of dsRNA with guanlylated polymers[J]. Frontiers in Physiology, 2018, 9: 316.
- [14] WHITTEN M. Novel RNAi delivery systems in the control of medical and veterinary pests[J]. Current Opinion in Insect Science, 2019, 34: 1-6.
- [15] LIN Y H, HUANG J H, LIU Y, et al. Oral delivery of dsRNA lipoplexes to German cockroach protects dsRNA from degradation and induces RNAi response[J]. Pest Management Science, 2017, 73 (5): 960-966.
- [16] 魏勇,何玉兰,郑学礼. RNAi在抗蚊媒病毒感染中的研究进展[J]. 遗传, 2020, 42(2): 153-160.
- [17] ZOTTI M, SANTOS E A D, CAGLIARI D, et al. RNA interference technology in crop protection against arthropod pests, pathogens and nematodes[J]. Pest Management Science, 2018, 74(6): 1239-1250.
- [18] PRENTICE K, CHRISTIAENS O, PERTRY I, et al. RNAi-based gene silencing through dsRNA injection or ingestion against the African sweet potato weevil *Cylas puncticollis* (Coleoptera: Brentidae)[J]. Pest Management Science, 2017, 73(1): 44-52.
- [19] HEAD G P, CARROLL M W, EVANS S P, et al. Evaluation of SmartStax and SmartStaxPRO maize against western corn rootworm and northern corn rootworm: efficacy and resistance management[J]. Pest Management Science, 2017, 73(9): 1883-1899.
- [20] FISHILEVICH E, BOWLING A J, FREY M L F, et al. RNAi targeting of rootworm troponin I transcripts confers root protection in maize[J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2019, 104: 20-29.
- [21] KONG Y, LIU X P, WAN P J, et al. The P450 enzyme shade mediates the hydroxylation of ecdysone to 20-hydroxyecdysone in the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* [J]. Insect Molecular Biology, 2014, 23(5): 632-643.
- [22] AVILA L A, CHANDRASEKAR R, WILKINSON K E, et al. Delivery of lethal dsRNAs in insect diets by branched amphiphilic peptide capsules[J]. Journal of Controlled Release, 2018, 273: 139-146.
- [23] SHANG F, DING B Y, YE C, et al. Evaluation of a cuticle protein gene as a potential RNAi target in aphids[J]. Pest Management Science, 2020, 76(1): 134-140.
- [24] ZHENG Y, HU Y, YAN S, et al. A polymer/detergent formulation improves dsRNA penetration through the body wall and RNAi-induced mortality in the soybean aphid *Aphis glycines*[J]. Pest Management Science, 2019, 75(7): 1993-1999.
- [25] SANTOS-ORTEGA Y, KILLINY N. Silencing of sucrose hydrolase causes nymph mortality and disturbs adult osmotic homeostasis in *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae)[J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2018, 101: 131-143.
- [26] LI T, CHEN J, FAN X, et al. MicroRNA and dsRNA targeting chitin synthase reveal a great potential for pest management of the hemipteran insect *Nilaparvata lugens*[J]. Pest Management Science, 2017, 73(7): 1529-1537.

- [27] IBRAHIM A B, MONTEIRO T R, CABRAL G B, et al. RNAi-mediated resistance to whitefly (*Bemisia tabaci*) in genetically engineered lettuce (*Lactuca sativa*)[J]. Transgenic Research, 2017, 26 (5): 613-624.
- [28] ZHANG C, YAN S Q, SHEN B B, et al. RNAi knock-down of the *Bemisia tabaci* Toll gene (*BtToll*) increases mortality after challenge with destruxin A[J]. Molecular Immunology, 2017, 88: 164-173.
- [29] MOGILICHERLA K, HOWELL J L, PALLI S R. Improving RNAi in the brown marmorated stink bug: identification of target genes and reference genes for RT-qPCR[J]. Scientific Reports, 2018, 8 (1): 3720.
- [30] GOGOI A, SARMAH N, KALDIS A, et al. Plant insects and mites uptake double-stranded RNA upon its exogenous application on tomato leaves[J]. Planta, 2017, 246(6): 1233-1241.
- [31] GUAN R, LI H, MIAO X. RNAi pest control and enhanced BT insecticidal efficiency achieved by dsRNA of chymotrypsin-like genes in *Ostrinia furnacalis*[J]. Journal of Pest Science, 2016, 90 (2): 745-757.
- [32] VATANPARAST M, KIM Y. Optimization of recombinant bacteria expressing dsRNA to enhance insecticidal activity against a lepidopteran insect, *Spodoptera exigua*[J]. PLoS One, 2017, 12(8): e0183054.
- [33] LIU Z, WANG X, DAI Y, et al. Expressing double-stranded RNAs of insect hormone-related genes enhances baculovirus insecticidal activity[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20 (2) :419.
- [34] GUO Z, KANG S, ZHU X, et al. The novel ABC transporter ABCH1 is a potential target for RNAi-based insect pest control and resistance management[J]. Scientific Reports, 2015, 5: 13728.
- [35] ELLANGO R, ASOKAN R, CHANDRA G S, et al. Tyrosine hydroxylase, a potential target for the RNAi-mediated management of diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae)[J]. Florida Entomologist, 2018, 101(1): 1-5.
- [36] PARSONS K H, MONDAL M H, McCORMICK C L, et al. Guanidinium-functionalized interpolyelectrolyte complexes enabling RNAi in resistant insect pests[J]. Biomacromolecules, 2018, 19(4): 1111-1117.
- [37] WU W, GU D, YAN S, et al. RNA interference of endoglucanases in the formosan subterranean termite *Coptotermes formosanus shiraki* (Blattodea: Rhinotermitidae) by dsRNA injection or ingestion[J]. Journal of Insect Physiology, 2019, 112: 15-22.
- [38] HAN S H, KIM J H, KIM K, et al. Selection of lethal genes for ingestion RNA interference against western flower thrips, *Frankliniella occidentalis*, via leaf disc-mediated dsRNA delivery[J]. Pesticide Biochemistry and Physiology, 2019, 161: 47-53.
- [39] KWON D H, PARK J H, ASHOK P A, et al. Screening of target genes for RNAi in *Tetranychus urticae* and RNAi toxicity enhancement by chimeric genes[J]. Pesticide Biochemistry and Physiology, 2016, 130: 1-7.
- [40] YOON J S, SAHOO D K, MAITI I B, et al. Identification of target genes for RNAi-mediated control of the two spotted spider mite[J]. Scientific Reports, 2018, 8(1): 14687.
- [41] SONG H, FAN Y, ZHANG J, et al. Contributions of dsRNases to differential RNAi efficiencies between the injection and oral delivery of dsRNA in *Locusta migratoria*[J]. Pest Management Science, 2019, 75(6): 1707-1717.
- [42] SPIT J, PHILIPS A, WYNANT N, et al. 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*[J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2017, 81: 103-116.
- [43] SONG H, ZHANG J, LI D, et al. A double-stranded RNA degrading enzyme reduces the efficiency of oral RNA interference in migratory locust[J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2017, 86: 68-80.
- [44] VELEZ A M, FISHILEVICH E. The mysteries of insect RNAi: a focus on dsRNA uptake and transport[J]. Pesticide Biochemistry and Physiology, 2018, 151: 25-31.
- [45] LI K L, WAN P J, WANG W X, et al. Ran involved in the development and reproduction is a potential target for rna-interference-based pest management in *Nilaparvata lugens*[J]. PLoS ONE, 2017, 10(11): e0142142.
- [46] POIRIER E Z, GOIC B, TOME-PODERTI L, et al. Dicer-2-dependent generation of viral dna from defective genomes of rna viruses modulates antiviral immunity in insects[J]. Cell Host Microbe, 2018, 23(3): 353-365.
- [47] WHYARD S, SINGH A D, WONG S. Ingested double-stranded RNAs can act as species-specific insecticides[J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2009, 39(11): 824-832.
- [48] MILLER S C, KEITA M, BROWN S J, et al. Dissecting systemic RNA interference in the red flour beetle *Tribolium castaneum*: parameters affecting the efficiency of RNAi[J]. PLoS ONE, 2012, 7 (10): e47431.
- [49] LI H, KHAJURIA C, RANGASAMY M, et al. Long dsRNA but not siRNA initiates RNAi in western corn rootworm larvae and adults [J]. Journal of Applied Entomology, 2015, 139(6): 432-445.
- [50] ZHANG Y, ZHANG Y, FU M, et al. RNA interference to control asian corn borer using dsrna from a novel glutathione-s-transferase gene of *Ostrinia furnacalis* (Lepidoptera: Crambidae)[J]. Journal of Insect Science, 2018, 18(5): 16.
- [51] BACHMAN P M, HUIZINGA K M, JENSEN P D, et al. Ecological risk assessment for *DvSnf7* RNA: a plant-incorporated protectant with targeted activity against western corn rootworm[J]. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 2016, 81: 77-88.
- [52] 王治文, 高翔, 马德君, 等. 核酸农药-极具潜力的新型植物保护产品[J]. 农药学报, 2019, 21(增刊1): 681-691.

(责任编辑:高蕾)