

◆ 专论:纳米农药(特约稿) ◆

RNA农药的研究现状和发展前景

关梅,晁子健,闫硕*,沈杰*

(中国农业大学植物保护学院植物生物安全系,农业农村部植物检疫害虫监测与防控重点实验室,北京 100193)

摘要:RNA农药被誉为第三次农药革命,在植物病虫害治理方面展现出巨大潜力。近年来,植物基因工程和基因干扰(RNAi)技术在RNA农药的研发中起到了关键作用。RNA农药的研发策略主要分为4种:寄主诱导的基因沉默策略(HIGS);病毒等微生物诱导的基因沉默策略(VIGS);喷雾诱导的基因沉默策略(SIGS);纳米载体递送的基因沉默策略(NDGS)。目前,RNA农药领域的研究大多集中在基础理论,而开发及应用能力相对较弱。鉴于此,本文总结了以RNAi为核心的病虫害防治技术的研究现状,介绍了基于RNAi技术防治病虫害的应用实例,阐明了叶绿体转基因技术及纳米递送平台的优势,并对未来开发低成本、安全和高效的RNAi产品做出了展望,以期对RNA农药的研究及商业化生产提供参考。

关键词:dsRNA;RNAi;病虫害;纳米载体;转基因

中图分类号:TQ 450;Q 812 文献标志码:A doi:10.3969/j.issn.1671-5284.2023.02.002

Research Status and Development Prospect of RNA Pesticide

GUAN Mei, CHAO Zijian, YAN Shuo*, SHEN Jie*

(Department of Plant Biosecurity and MARA Key Laboratory of Surveillance and Management for Plant Quarantine Pests, College of Plant Protection, China Agriculture University, Beijing 100193, China)

Abstract: RNA pesticide is regarded as the third pesticide revolution, showing great potential in controlling plant diseases and pests. In recent years, plant genetic engineering and RNA interference (RNAi) techniques have played an important role in the research and development of RNA pesticide. There are mainly four strategies for the research and development of RNA pesticide: host induced gene silencing (HIGS), virus induced gene silencing (VIGS), spray induced gene silencing (SIGS), nanocarrier delivered gene silencing (NDGS). Most of research in the field of RNA pesticide focuses on the basic theories, and the abilities of development and application are relatively weak. In view of this, the review summarized the research status of RNAi-based technologies for plant diseases and pest management, introduced the application examples of RNAi-based pest management strategies, illustrated the advantages of chloroplast transgenic technologies and nano-delivery platforms, as well as proposed the strategies for developing low-cost, safe and efficient RNAi products in the future. It provided references for research and commercial production of RNA pesticide.

Key words: dsRNA; RNAi; plant disease and pest; nanocarrier; transgenesis

基因干扰(RNAi)是一种在动物、植物和微生物中高度保守的基因表达调控工具。1998年,Fire等^[1]首次在秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*)中证明

了触发基因沉默的关键因子是双链RNA(dsRNA),而非单链RNA。具体而言,dsRNA被Dicer-like蛋白随机剪切成长度为21~24 nt的小RNA(siRNA或

收稿日期:2023-02-24

基金项目:国家自然科学基金(32030012)

作者简介:关梅(1997—),女,湖北潜江人,博士研究生,研究方向为RNA纳米制剂研究。E-mail:1843765226@qq.com

通信作者:沈杰(1971—),男,安徽合肥人,博士,教授,主要从事RNA纳米制剂和纳米农药研究。E-mail:shenjie@cau.edu.cn

共同通信作者:闫硕(1986—),男,黑龙江哈尔滨人,博士,副教授,主要从事RNA纳米制剂和纳米农药研究。E-mail:yan-shuo2011@foxmail.com

miRNA), siRNA 与 Argonaute 蛋白 (AGOs) 结合形成 RNA 诱导的沉默复合体 (RISCs), 该复合体与目标 RNA 链互补, 诱导 mRNA 降解或抑制翻译进程^[2]。利用 RNAi 技术靶向有害生物的必须基因, 实现高效的基因沉默, 可有效控制病虫害的发生。基于 RNAi 技术创制的新型核酸农药被称为农药史上第三次革命, 与传统化学农药相比, 具有靶向性高、易降解、靶点丰富及可灵活设计等优势。目前, RNAi 在植物病虫害防控领域的应用主要通过 4 种途径实现 (图 1): (1) HIGS, 即培育表达 dsRNA 的转基因植物以防治病虫害; (2) VIGS, 即利用病毒或微生物表达和递送靶标生物 dsRNA 的方法; (3) SIGS, 即创制喷

洒型 RNA 农药, 直接喷施于植物表面以控制病原菌和害虫^[3]; (4) NDGS, 即利用纳米载体递送 dsRNA 以诱导靶标基因沉默的方法。

本文介绍了以 RNAi 为核心的病虫害防治技术的研究现状, 分别论述了基于 HIGS、VIGS、SIGS 和 NDGS 策略的 RNAi 技术用于防治植物病虫害的应用实例及商业化情况, 并对核转基因技术培育转基因作物和创制喷洒型 RNA 农药的瓶颈问题进行总结, 点明了叶绿体介导的 RNAi 技术和纳米载体递送 dsRNA 策略的优势。dsRNA 的合成成本、保护剂和载体制备工艺、转基因植物和载体的生物安全性评估, 仍然是未来在研发和商业化生产中需要关注的问题。

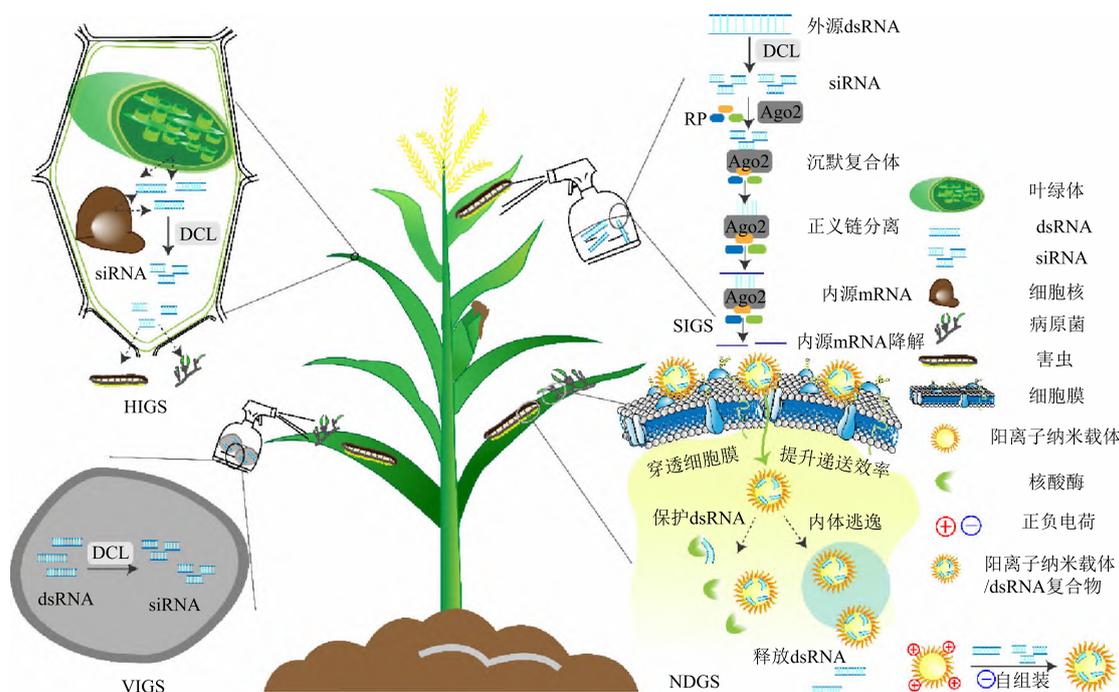


图 1 RNAi 在植物病虫害防控领域的 4 种应用策略示意图

1 利用 HIGS 策略防控病虫害

1.1 核转基因技术的应用

研究人员已成功实现利用转基因植物表达调控病虫害生长发育关键基因 dsRNA, 降低靶基因的表达量, 导致靶标生物死亡或发育畸形, 从而控制病虫害发展的策略。通过核转基因工程向细胞核导入外源基因的核基因转化技术是一种主要的 HIGS 策略^[4]。例如, 在对咀嚼式口器害虫的防治中, Zhu 等^[5]报道了一种表达棉铃虫 (*Helicoverpa armigera*) 蜕皮基因 (*ECR*) dsRNA 的转基因烟草, 幼虫取食烟草后出现死亡和蜕皮缺陷的现象, 从而提高了转基因烟草对害虫的抗性。在另一项报道中, Mamta 等^[6]选择

了害虫蜕皮必需的几丁质酶基因 (*HaCHI*) 作为靶标, 构建了表达 dsRNA 的转基因番茄和烟草品系, 取食转基因植物的棉铃虫表现出生长迟缓和死亡率高, 蛹和成虫均出现了发育畸形的现象。在对刺吸式害虫的防治中, Coleman 等^[7]采用表达 *dsRack1*, *dsMpC002* 和 *dsMpPintO2* 的转基因拟南芥饲喂蚜虫, 虫体内的基因表达量降低 70%, 蚜虫的繁殖能力下降 40%~60%。Murtaza 等^[8]通过转基因马铃薯表达蚜虫巨噬细胞抑制因子 (*MIF1*) 的 dsRNA, 诱导蚜虫基因沉默并导致死亡, 不同转基因马铃薯品系对蚜虫基因沉默的效率为 30%~62%。在植物病害防控领域, Nowara 等^[9]将靶向病原菌葡聚糖转移酶基因 (*GTF1/2*) 的 dsRNA 转入大麦和小麦中, 有效抑制

了真菌的生长,提高了大麦和小麦植株对病原菌的抗性。在对土传病害的防治中,Zhang等^[10]报道了一种表达*microRNA166*和*microRNA159*的小RNA转基因棉花,靶向沉默大丽轮枝菌(*Verticillium dahliae*)中的毒力基因和菌丝生长基因,提高了转基因棉花对大丽轮枝菌的抗性。Matho等^[11]构建了表达病原菌*CgCOM1*基因siRNA的转基因辣椒和番茄,其对炭疽病原菌分生孢子的萌发、胚管发育、菌丝形成和生长有抑制作用,增强了茄科作物对炭疽病的抗性。

1.2 基于核转基因技术培育转基因作物的瓶颈

虽然核转基因技术在防治病虫害领域取得了显著成果,但是传统核转基因技术表达的dsRNA会进入植物细胞质,被植物自身的Dicer酶识别和剪切,导致dsRNA无法在细胞内稳定积累,难以被加工成有效的siRNA,影响了对靶标生物的RNAi效率和防控效果,导致转基因作物的抗虫效果不明显^[12]。以叶绿体基因组作为遗传操作平台的叶绿体(质体)基因工程技术克服了核转基因技术中的缺陷,拓宽了植物基因工程在防治病虫害领域的应用^[12-13]。

1.3 叶绿体转基因技术的应用

植物细胞中质体基因组的拷贝数可达1万,且缺乏RNAi机制,使得质体转基因技术成为表达dsRNA的理想工具^[14]。近年来,相比于核转基因技术,叶绿体基因工程的优势逐渐显现,如减少了核转基因技术对植物生长发育的影响;在叶绿体中能稳定积累dsRNA以避免进入植物自身的RNAi系统等,这使得叶绿体转基因技术成为植物基因工程的一个新研究热点。Zhang等^[15]报道了一种马铃薯质体基因组表达*dsACT*的方法,可用于马铃薯甲虫(*Leptinotarsa decemlineata*)的防控。由于质体中积累了丰富的dsRNA,且维持了dsRNA的完整性,使得质体转基因技术诱导的RNAi效率比核转基因技术更高。最近,Zhang等^[16]报道了能够表达dsRNA或发夹RNA(hpRNA)的转基因马铃薯,用于防治茄二十八星瓢虫(*Henosepilachna vigintioctopunctata*)。与核转基因技术相比,叶绿体介导的RNAi不会影响转基因马铃薯叶片的正常发育和形貌,且在害虫取食叶片后,幼虫的死亡率更高,有效减少了茄二十八星瓢虫对茄科作物的危害。在另一项报道中,Wu等^[17]分别通过核转基因技术和叶绿体转基因技术培育了表达西花蓟马(*Frankliniella occidentalis*) β -actin、Tubulin、V-ATPase和Snf7基因dsRNA的转基因植物,发现利用叶绿体转基因技术的dsRNA表达量比核

转基因技术更多,提高了西花蓟马的致死率,为植物提供了更有效的保护,但基于叶绿体转基因技术对西花蓟马^[17]、桃蚜(*Myzus persicae*)和烟粉虱(*Bemisia tabaci*)等农业害虫的防治效率并不相同^[18],可能与不同物种间的摄食习惯以及对RNAi的敏感程度存在差异有关。目前,叶绿体介导的RNAi技术在防治植物病害方面的研究较少,但有一些基于叶绿体转基因技术表达抗菌蛋白,用于提高植物抗病性的研究,如Degray等^[19]报道了一种表达抗菌肽的转基因烟草,其叶片及叶片提取物均对真菌的生长和发育有抑制作用。

2 利用VIGS策略防控病虫害

在农业领域,利用VIGS策略不仅能够改善农艺性状,还能防治病虫害,为作物提供保护。病毒是VIGS策略中的主要载体,由于病毒独特的侵染机制,能有效帮助dsRNA逃脱生物体的物理和生理屏障,在寄主体内实现dsRNA的高效递送^[20]。例如,Taning等^[21]对昆虫单链RNA病毒进行修饰,用于表达黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*)特异性的dsRNA,从而促进了昆虫吸收dsRNA的能力。此外,利用微生物表达和递送dsRNA的方法也被归属于VIGS策略。例如,采用能产生dsRNA的大肠杆菌(*Escherichia coli*)喂养昆虫,不仅可以避免dsRNA被昆虫消化系统中的酶降解,还能实现dsRNA的可持续供应^[22]。此外,利用共生菌产生害虫特异性的dsRNA,是一种无创伤递送dsRNA的方法,适用于多种靶标害虫^[23]。当靶标害虫摄入共生细菌后,细菌能在害虫体内持续增殖,保障充足的dsRNA,实现可持续的基因沉默^[24]。在植物病害防治应用中,Islam等^[25]报道了一种基于微细胞递送的dsRNA策略,用于防治灰霉病。由微细胞同时递送多个dsRNA比单一dsRNA的RNAi效率更高,对灰葡萄孢的生长具有更高的抑制活性,但利用病毒或微生物作为表达和递送的载体,在实际应用中存在传播病原物的风险。

3 利用SIGS策略防控病虫害

研究人员对喷洒型RNA农药防治农业病虫害进行了广泛的试验,证明SIGS是一种具有潜力的非转基因RNAi策略^[3]。SIGS策略比HIGS策略在病虫害防治中具有更广阔的应用前景。例如,喷洒型的RNA农药研发成本低,周期较短,应用场景多且无需面临严格的市场监管和登记审查。当dsRNA能够廉价、大规模地生产时,喷洒型RNA农药将是防治

病虫害的理想药剂。例如,Chakraborty等^[26]将针对烟粉虱*hsp70*基因的dsRNA药剂直接喷洒于辣椒植株上,烟粉虱取食后死亡率为67.7%,成功诱导了烟粉虱中靶基因的沉默,且减少了虫体内病毒的数量,从而使病毒病在辣椒植株中的传播效率降低了75%。针对另一种传播病原微生物的害虫,Killiny等^[27]在体外直接喷洒靶向柑橘木虱(*Diaphorina citri*)抗性代谢基因(*p450*)的dsRNA。该dsRNA药剂能穿透害虫的角质层并成功诱导RNAi,提升了害虫对化学杀虫药剂的敏感水平。在植物病害防治领域,Wang等^[28]直接在水果、蔬菜和花卉叶面喷洒靶向灰葡萄孢(*Botrytis cinerea*)*DCL1*和*DCL2*基因的dsRNA,成功诱导了灰葡萄孢中靶基因的沉默,有效抑制了灰葡萄孢的生长和分生孢子的形成,提升了采后果蔬对灰葡萄孢的抗性。Duanis-Assaf等^[29]以灰葡萄孢的菌膜合成基因为靶标,合成了喷洒型*dsERG1*、*dsERG11*和*dsERG13*药剂,显著抑制了果蔬表面灰葡萄孢分生孢子的萌发和胚管的伸长。在对另一种气传病害的防治中,Sarkar等^[30]将针对稻瘟病原的*dsMoDES1*药剂直接喷洒于植物表面,病原菌的靶基因表达量降低了35%,减少了叶片表面病原菌的丰度,抑制了病原菌的生长和分生孢子的形成。

4 利用NDGS策略防控病虫害

4.1 创制喷洒型RNA农药的瓶颈

喷洒型RNA农药在植物表面能直接被昆虫或病原微生物吸收,诱导有害生物靶标基因的沉默。在实际生产应用中,喷洒型RNA农药受诸多环境因素限制。有研究报道,直接喷施的dsRNA暴露于空气中会被核酸酶和紫外线降解^[3],而在自然环境中,雨水冲刷和气流变化会直接影响植物叶面dsRNA的积累量,导致无法触发有效的RNAi反应。昆虫或病原微生物内部的核酸酶和pH环境都会影响dsRNA的稳定性^[12],严重影响了RNA农药在有害生物体内的干扰效率。此外,昆虫的体壁和微生物的细胞壁是阻碍dsRNA摄入的主要物理屏障,降低了喷洒型RNA农药的递送效率。Qiao等^[31]发现多种致病性病原菌对dsRNA的摄取效率不同,导致不同病原菌对RNAi的敏感性存在差异。例如,疫霉吸收dsRNA的能力非常有限,炭疽菌则不能直接吸收dsRNA,而有益真菌绿色木霉吸收dsRNA的能力较弱。因此,研发纳米载体保护和递送dsRNA来克服喷洒型RNA农药应用瓶颈已成为前沿热点。

4.2 纳米载体对dsRNA的保护

由于dsRNA被植物吸收不是一个瞬时的过程,有延迟效应,喷洒型RNA农药在田间的应用效率与dsRNA在环境中的稳定性密切相关。高效的RNAi依赖于充足的dsRNA,但实际应用中诸多因素会影响dsRNA在植物表面的积累。基于纳米载体的递送策略能高效保护dsRNA,提升dsRNA在工作环境下的稳定性。纳米载体不仅能增加dsRNA在叶面的滞留量,减少因喷雾飘移而造成的损失^[3],还能保护dsRNA免受核酸酶降解和生物体内pH微环境的影响,提高dsRNA在生物体内的稳定性^[32]。有研究报道以生物黏土作为dsRNA的递送载体,发现其能够减少dsRNA因冲淋而产生的流失,提升了RNAi效率,延长了植物对病毒病的抗性周期^[33]。在另一项报道中,阳离子聚合物作为dsRNA的递送载体,在昆虫高碱性的肠道环境中为dsRNA提供了保护,提升了甜菜夜蛾(*Spodoptera exigua*)的RNAi效率^[34]。

4.3 纳米载体对dsRNA的递送

基于纳米载体的递送策略还能有效促进dsRNA在细胞内的扩散、摄取和内体逃逸,通过上调一些与摄取机制相关的基因,激活网格蛋白介导的内吞作用,提升dsRNA的递送效率^[35-36]。在细胞摄取纳米RNA复合物后,有些带胺基的纳米载体在细胞内酸性环境中会出现质子化效应,诱发溶酶体逃逸,释放dsRNA或siRNA进入细胞质,大幅度提升RNAi的递送效率^[36]。例如,Zheng等^[37]报道了一种含有表面活性剂、阳离子型纳米载体和dsRNA的混合制剂,该制剂可以快速穿透蚜虫体壁进入血腔,有效提升了dsRNA的递送效率,导致蚜虫靶基因的表达量下降了95%。此外,这种纳米载体还能穿透植物表皮屏障,将外源dsRNA送入植物体内,提升了dsRNA进入植物细胞的能力。Yang等^[38]报道了纳米载体递送的miRNA可被拟南芥和玉米高效吸收,在植物根系和茎段中均能够检测到大量的miRNA存在,比单一的dsRNA进入植物内部的效率更高。油菜的叶片也能吸收叶片正面喷洒的dsRNA,从而对叶片背面的蚜虫产生胃毒效果^[39]。

5 RNA农药应用实例

5.1 转基因植物介导RNAi的应用实例

基于转基因植物介导的RNAi技术在防治病虫害领域表现出巨大的应用潜力。Baum等^[40]通过转基因玉米表达玉米根萤叶甲(*Diabrotica virgifera virgifera*)的*dsV-ATPaseA*基因,诱导虫体内靶基因

沉默,导致幼虫出现死亡和发育迟缓的现象。在一些包含田间试验的科研型案例中,基于转基因植物介导的RNAi技术用于防治病虫害展现出良好的商业化前景。例如,Liang等^[41]报道了一种表达绿盲蝽(*Apolygus lucorum*)致死基因(*LIM*) dsRNA的转基因棉花植株。在田间试验中,转基因棉花的叶片受损面积比正常植株减少了46%~53%,转基因棉花的单铃重量较正常植株增大了48%,有效减少了绿盲蝽对棉花产量和质量的损害。Mao等^[42]用转基因拟南芥和烟草表达棉铃虫细胞色素P450的*CYP6AE14*基因dsRNA,诱导棉铃虫幼虫的基因沉默,导致幼虫生长迟缓,降低了幼虫对棉酚的耐受能力,提高了转基因植株对棉铃虫的抗性,为田间治理棉铃虫提供了可行策略。此外,在防治植物病害的应用方面,Zhang等^[43]报道了一种表达大丽轮枝菌疏水蛋白*vdHI*基因dsRNA的转基因棉花,并在田间得到成功应用。由于转基因棉花表达真菌*vdHI*基因的dsRNA能够成功运输到真菌细胞中,并诱导病菌的基因沉默,阻碍了病原菌微菌核的形成,有效提高了转基因植株对大丽轮枝菌的抗性。拜耳、先正达等国际农药公司投入大量的人力和财力,并掀起了研发和商品化转基因植物的热潮。目前,拜耳公司在转基因玉米方面的研发已取得了显著成果,并基本投入商业化生产^[44]。

5.2 非转基因形式RNA农药的应用实例

目前,非转基因形式RNA农药在田间的有效性得到了越来越多的验证,但非转基因形式的RNA农药在田间应用案例较少,主要的障碍可能是生产dsRNA的成本高昂。dsRNA制剂易应用于甲虫类害虫。例如,Petek等^[45]报道了在田间喷施dsRNA药剂以防治马铃薯甲虫。在喷药初期,dsRNA药剂对害虫的防治效果为32%,不如化学药剂的防治效果,但在施药7 d后,dsRNA制剂的防治效果与市售杀虫剂类似,达到了84%~95%^[45]。在对另一种甲虫的防治研究中,Chen等^[46]在田间喷洒了6种用细菌表达的dsRNA药剂,在施药8 d内,茄二十八星瓢虫的死亡率达到100%,在施药后的10 d内茄二十八星瓢虫的平均死亡率仍大于90%,且对天敌龟纹瓢虫(*Propylea japonica*)几乎没有负面影响。在田间喷洒RNA农药防治其他害虫,如鳞翅目和半翅目害虫的效果似乎不如甲虫类,部分原因在于甲虫类具有较少的降解酶且dsRNA不易被溶酶体消化,因而适合用于RNAi^[12]。Ma等^[39]报道了一种大肠杆菌表达双基因(*ATP-d*和*ATP-G*) dsRNA的药剂,在温室中对蚜虫

的防效达60%。2019年,拜耳公司申请了喷洒型dsRNA用于防治蜜蜂狄斯瓦螨(*Varroa destructor*)的产品登记。2022年,美国Greenlight Biosciences公司宣布申请登记了一种用于防治马铃薯甲虫的喷洒型dsRNA制剂。在防治植物病害方面,该公司宣布正在积极研发基于RNAi策略防治白粉病和灰霉病的喷雾型产品,预计于2025年获得批准上市。硅羿科技有限公司研发的烟草花叶病毒核酸干扰素目前已经完成登记测试,这种干扰素能够有效减少病毒病对烟草或其他茄科植物造成的经济损失。

6 展望

6.1 靶基因的筛选

靶基因筛选是影响RNAi效率的关键因素之一。理想的靶基因应该具备高致死和低剂量敏感等特点。若单个靶基因效果不好,可以2个或多个靶基因同时干扰,从而提升有害生物的死亡率^[47]。靶基因的筛选和挖掘是一项费时费力的工作,需要更多的研发投入。

6.2 低成本dsRNA的研发与工艺优化

基于RNAi技术防治病虫害的商业化案例有限,很大程度上受限于dsRNA的研发成本和复杂的工艺。目前,无论是在体内或体外合成dsRNA,主要是依赖噬菌体的T7序列和RNA聚合酶转录获得特异性序列^[48]。在植物基因工程中,培育表达靶标生物dsRNA的转基因植物耗时长、步骤复杂、效率低且成本高昂。在喷洒型RNA农药的研发中,如果采用商业化试剂盒合成所需的dsRNA,步骤虽然相对简单,但试剂成本高昂,生产规模小,且容易发生非特异性扩增导致dsRNA质量不佳。大肠杆菌或酵母表达体系是dsRNA低成本大批量合成的最常用工具。例如,Ma等^[49]报道了一种用于大量表达dsRNA的工程菌。较目前市面上广泛使用的L4440-HT115 (DE3)系统,新表达体系的dsRNA产率可提升3倍。美国Greenlight Biosciences公司建立了以酿酒酵母发酵生产dsRNA的平台,通过在酵母中表达dsRNA用于害虫治理。该公司还开发了成本为0.5美元/g的dsRNA产品用于抗病或杀虫,适合实际生产应用。此外,利用微生物产生特异性的dsRNA以诱导靶标生物的RNAi,在防治病虫害方面具有良好的应用前景。由于真菌、病毒或细菌的修饰相对容易,且能持续产生dsRNA,因而在基因递送和蛋白质表达方面都有应用^[44,50]。由于纳米材料载体对RNA制剂的高效保护和递送作用,低成本环保型纳米载体的需求无

疑会越来越来。目前,我国科研界使用较多的星形阳离子聚合物纳米载体(SPc)的生产成本约为1.3美元/g,当大规模工业化生产后,能够进一步降低生产成本^[32]。

6.3 基于递送策略的安全性

目前,基于纳米载体、菌液或病毒的递送策略已被证实能有效提高dsRNA的递送效率并为其提供保护。其中,纳米材料作为递送载体的生物安全性一直备受关注,即纳米材料的降解问题、在环境中的扩散风险以及对非靶标生物的毒性^[51]。Dong等^[52]评估了星型阳离子纳米载体(SPc)对天敌昆虫的生物毒性。正常田间使用浓度无不良副作用,只有在极高浓度下,虽然不会影响异色瓢虫(*Harmonia axyridis*)卵的孵化率,但会降低多种膜蛋白和溶酶体基因的表达量,损伤昆虫的肠道组织,导致幼虫死亡。另外,Yan等^[53]利用黑腹果蝇作为模式昆虫,评估了作为dsRNA的递送载体SPc对幼虫生活性状的影响。该研究发现,只有极高浓度(1 g/L)的SPc才会对果蝇的寿命、生育能力、攀爬能力以及抗逆性产生不利的影响,长期饲喂SPc则会积累在果蝇肠道组织中,并引起全身性变化。这些工作为评估纳米材料的生物安全性提供了方法和参考。另外,基于微生物系统的递送平台在环境中传播也可能会对人产生潜在的威胁。

6.4 基于4种策略的应用前景

6.4.1 HIGS策略

生物技术的快速发展使得培育抗虫或抗病转基因作物的方法越来越丰富,尤其是质体转基因技术在防治病虫害领域的应用。有研究报道,质体转基因技术通过表达多基因组元件,可同时赋予转基因植物对虫害、病害和非生物胁迫条件的抗性^[54]。虽然在一些单子叶植物中,由于缺乏叶片的再生体系,质体转基因技术无法利用多次再生培养和筛选来获得转化植株,但该技术符合植物基因工程未来的发展方向,即安全、稳定和高效地表达有害生物的靶标基因dsRNA,因而将广泛地应用于农业领域。

6.4.2 VIGS策略

在农业病虫害治理方面,以病毒或微生物作为dsRNA的载体用于触发靶标生物RNAi的策略具有应用潜力。未来,将病毒或微生物作为dsRNA的高效递送载体,还需要开发导入产生特异性dsRNA所需模板的有效方法^[44],为大规模创制施用药剂奠定基础。另外,病毒或微生物在田间大规模施用之前,亟需解决的是在环境中释放病毒或微生物所引起

的潜在问题。

6.4.3 SIGS策略

近年来,喷洒型RNA农药在病虫害防治领域取得了长足的进展,具有广阔的应用前景。例如,研发喷洒型RNA农药所需的时间比培育转基因植物短,喷洒型RNA农药能够相对快速地应对新环境和新入侵的病虫害,从而实现病虫害的应急管理。虽然,喷洒型RNA农药在田间大规模应用之前还需要克服诸多瓶颈限制,但目前已有基于载体或其他保护剂的递送系统用于提升dsRNA的稳定性和递送效率,从而实现喷洒型RNA农药对病虫害的高效治理。

6.4.4 NDGS策略

利用纳米载体来保护和递送RNA农药快速进入植物和害虫体内无疑具备广阔的发展前景。此外,可通过研发多元化的RNA制剂解决RNA农药田间防效不理想的困境。Yan等^[55]提出了一种利用纳米载体同时递送药剂和靶向害虫药剂敏感基因或抗药基因的RNA农药新策略。Li等^[56]采用纳米载体同时递送苦参碱和靶向桃蚜的dsRNA。纳米载体通过内部的疏水结构结合苦参碱,同时借助外部基团的电荷作用及氢键作用进一步结合dsRNA,通过RNAi引起桃蚜细菌性感染,防效可提升至90%,与化学农药的防效相当。这种利用纳米载体同时装载dsRNA和药剂的新思路可以治理害虫的抗药性、大幅度提升害虫的防治效果。Wei等^[57]利用纳米载体递送棉蚜CYP6CY3基因的dsRNA,干扰了棉蚜的解毒基因,使得抗性蚜虫恢复了对吡虫啉的敏感性,致死率从40%上升到80%。Qu等^[58]报道了一种基于纳米载体同时递送dsRNA和噻虫嗪的复合药剂。干扰蚜虫对噻虫嗪应急响应基因synapsin之后,半数致死剂量条件下的噻虫嗪对蚜虫的致死率上升至100%,低剂量噻虫嗪对蚜虫的致死率也能达到90%。未来,还应该进一步设计智能响应型纳米载体(机器人),实现多功能、精准靶向和可控递送,不断提升RNA农药的田间效果,使其接近或达到化学农药的防治效果。

参考文献

- [1] 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.
- [2] HAMMOND S M, CAUDY A A, HANNON G J. Post-transcriptional gene silencing by double-stranded RNA[J]. Nature Reviews Genetics, 2001, 2(2): 110-119.
- [3] HOANG B T L, FLETCHER S J, BROSNAN C A, et al. RNAi as a foliar spray: efficiency and challenges to field applications [J].

- International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(12): 6639.
- [4] ROBINSON A S, FRANZ G, ATKINSON P W, et al. Insect transgenesis and its potential role in agriculture and human health [J]. *Insect Biochemistry And Molecular Biology*, 2004, 34 (2): 113-120.
- [5] ZHU J Q, LIU S, MA Y, et al. Improvement of pest resistance in transgenic tobacco plants expressing dsRNA of an insect-associated gene *Ecr*[J]. *Plos One*, 2012, 7(6): e38572.
- [6] MAMTA, REDDY K R, RAJAM M V. Targeting chitinase gene of *Helicoverpa armigera* by host-induced RNA interference confers insect resistance in tobacco and tomato[J]. *Plant Molecular Biology*, 2016, 90(3): 281-292.
- [7] COLEMAN A D, WOUTERS R H, MUGFORD S T, et al. Persistence and transgenerational effect of plant-mediated RNAi in aphids[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2015, 66(2): 541-548.
- [8] MURTAZA S, TABASSUM B, TARIQ M, et al. Silencing a *Myzus persicae* macrophage inhibitory factor by plant-mediated RNAi induces enhanced aphid mortality coupled with boosted RNAi efficacy in transgenic potato lines[J]. *Molecular Biotechnology*, 2022, 64(10): 1152-1163.
- [9] NOWARA D, GAY A, LACOMME C, et al. HIGS: host-induced gene silencing in the obligate biotrophic fungal pathogen *Blumeria graminis*[J]. *Plant Cell*, 2010, 22(9): 3130-3141.
- [10] ZHANG T, ZHAO Y L, ZHAO J H, et al. Cotton plants export microRNAs to inhibit virulence gene expression in a fungal pathogen[J]. *Nature Plants*, 2016, 2(10): 16153.
- [11] MAHTO B K, SINGH A, PAREEK M, et al. Host-induced silencing of the *Colletotrichum gloeosporioides conidial morphology 1* gene (*CgCOM1*) confers resistance against Anthracnose disease in chilli and tomato[J]. *Plant Molecular Biology*, 2020, 104 (4-5): 381-395.
- [12] YAN S, REN B Y, SHEN J. Nanoparticle-mediated double-stranded RNA delivery system: a promising approach for sustainable pest management[J]. *Insect Science*, 2021, 28(1): 21-34.
- [13] FLAVELL R, MATHIAS R. Genetic engineering: prospects for transforming monocot crop plants[J]. *Nature*, 1984, 307: 108-109.
- [14] BALLY J, MCINTYRE G J, DORAN R L, et al. In-plant protection against *Helicoverpa armigera* by production of long hpRNA in chloroplasts[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 7: 1453.
- [15] ZHANG J, KHAN S A, HASSE C, et al. Full crop protection from an insect pest by expression of long double-stranded RNAs in plastids[J]. *Science*, 2015, 347(6225): 991-994.
- [16] XU W, ZHANG M, LI Y, et al. Complete protection from *Henosepilachna vigintioctopunctata* by expressing long double-stranded RNAs in potato plastids[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2022.
- [17] WU M, DONG Y, ZHANG Q, et al. Efficient control of western flower thrips by plastid-mediated RNA interference[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2022, 119 (15): e2120081119.
- [18] ZHANG J, KHAN S A, HECKEL D G, et al. Next-generation insect-resistant plants: RNAi-mediated crop protection[J]. *Trends in Biotechnology*, 2017, 35(9): 871-882.
- [19] DEGRAY G, RAJASEKARAN K, SMITH F, et al. Expression of an antimicrobial peptide via the chloroplast genome to control phytopathogenic bacteria and fungi[J]. *Plant Physiology*, 2001, 127 (3): 852-862.
- [20] KOLLIPOULOU A, TANING C N T, SMAGGHE G, et al. Viral delivery of dsRNA for control of insect agricultural pests and vectors of human disease: prospects and challenges[J]. *Frontiers in Physiology*, 2017, 8: 399.
- [21] TANING C N T, CHRISTIAENS O, LI X, et al. Engineered flock house virus for targeted gene suppression through RNAi in fruit flies (*Drosophila melanogaster*) *in vitro* and *in vivo*[J]. *Frontiers in Physiology*, 2018, 9: 805.
- [22] SILVER K, COOPER A M, ZHU K Y. Strategies for enhancing the efficiency of RNA interference in insects[J]. *Pest Management Science*, 2021, 77(6): 2645-2658.
- [23] WHITTEN M M, FACEY P D, DEL SOL R, et al. Symbiont-mediated RNA interference in insects[J]. *Proceedings Biological Sciences*, 2016, 283(1825): 20160042.
- [24] WHITTEN M, DYSON P. Gene silencing in non-model insects: overcoming hurdles using symbiotic bacteria for trauma-free sustainable delivery of RNA interference: sustained RNA interference in insects mediated by symbiotic bacteria: applications as a genetic tool and as a bioicide[J]. *Bioessays*, 2017, 39(3): 1600247.
- [25] ISLAM M T, DAVIS Z, CHEN L, et al. Minicell-based fungal RNAi delivery for sustainable crop protection[J]. *Microbial Biotechnology*, 2021, 14(4): 1847-1856.
- [26] CHAKRABORTY P, GHOSH A. Topical spray of dsRNA induces mortality and inhibits chilli leaf curl virus transmission by *Bemisia tabaci* Asia II 1[J]. *Cells*, 2022, 11(5): 833.
- [27] KILLINY N, HAJERI S, TIWARI S, et al. Double-stranded RNA uptake through topical application, mediates silencing of five *CYP4* genes and suppresses insecticide resistance in *Diaphorina citri*[J]. *PloS One*, 2014, 9(10): e110536.
- [28] WANG M, WEIBERG A, LIN F M, et al. Bidirectional cross-kingdom RNAi and fungal uptake of external RNAs confer plant protection[J]. *Nature Plants*, 2016, 2: 16151.
- [29] DUANIS-ASSAF D, GALSURKER O, DAVYDOV O, et al. Double-stranded RNA targeting fungal ergosterol biosynthesis pathway controls *Botrytis cinerea* and postharvest grey mould[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2022, 20(1): 226-237.
- [30] SARKAR A, ROY-BARMAN S. Spray-induced silencing of pathogenicity gene *MoDESI* via exogenous double-stranded RNA can confer partial resistance against fungal blast in rice[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2021, 12: 733129.
- [31] QIAO L, LAN C, CAPRIOTTI L, et al. Spray-induced gene silencing for disease control is dependent on the efficiency of pathogen RNA uptake[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2021, 19 (9):

- 1756-1768.
- [32] YAN S, YIN M Z, SHEN J. Nanoparticle-based nontransformative RNA insecticides for sustainable pest control: mechanisms, current status and challenges[J]. *Entomologia Generalis*, 2022, 43(1): 21-30.
- [33] MITTER N, WORRALL E A, ROBINSON K E, et al. Clay nanosheets for topical delivery of RNAi for sustained protection against plant viruses[J]. *Nature Plants*, 2017, 3: 16207.
- [34] CHRISTIAENS O, TARDAJOS M G, MARTINEZ REYNA Z L, et al. Increased RNAi efficacy in *Spodoptera exigua* via the formulation of dsRNA with guanylated polymers[J]. *Frontiers in Physiology*, 2018, 9: 316.
- [35] MA Z, ZHENG Y, CHAO Z, et al. Visualization of the process of a nanocarrier-mediated gene delivery: stabilization, endocytosis and endosomal escape of genes for intracellular spreading [J]. *Journal of Nanobiotechnology*, 2022, 20(1): 124.
- [36] YAN S, REN B, ZENG B, et al. Improving RNAi efficiency for pest control in crop species[J]. *Biotechniques*, 2020, 68(5): 283-290.
- [37] 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.
- [38] YANG J, YAN S, XIE S, et al. Construction and application of star polycation nanocarrier-based microRNA delivery system in *Arabidopsis* and maize[J]. *Journal of Nanobiotechnology*, 2022, 20(1): 219.
- [39] MA Z Z, ZHANG Y H, LI M S, et al. A first greenhouse application of bacteria-expressed and nanocarrier-delivered RNA pesticide for *Myzus persicae* control[J]. *Pest Management Science*, 2023, 96(1): 181-193.
- [40] BAUM J A, BOGAERT T, CLINTON W, et al. Control of coleopteran insect pests through RNA interference[J]. *Nature Biotechnology*, 2007, 25(11): 1322-1326.
- [41] LIANG S, LUO J, ALARIQI M, et al. Silencing of a *LIM* gene in cotton exhibits enhanced resistance against *Apoligus lucorum* [J]. *Journal of Cellular Physiology*, 2021, 236(8): 5921-5936.
- [42] MAO Y B, CAI W J, WANG J W, et al. Silencing a cotton bollworm P450 monooxygenase gene by plant-mediated RNAi impairs larval tolerance of gossypol[J]. *Nature Biotechnology*, 2007, 25(11): 1307-1313.
- [43] ZHANG T, ZHAO J H, FANG Y Y, et al. Exploring the effectiveness and durability of trans-kingdom silencing of fungal genes in the vascular pathogen *Verticillium dahliae* [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(5): 2742.
- [44] CHRISTIAENS O, WHYARDS S, VÉLEZ A M, et al. Double-stranded RNA technology to control insect pests: current status and challenges[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2020, 11: 451.
- [45] PETEK M, COLL A, FERENC R, et al. Validating the potential of double-stranded RNA targeting colorado potato beetle *Mesh* gene in laboratory and field trials[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2020, 11: 1250.
- [46] CHEN S, LUO X, NANDA S, et al. RNAi-based biopesticides against 28-spotted ladybeetle *Henosepilachna vigintioctopunctata* does not harm the insect predator *Propylea japonica* [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2023, 71(7): 3373-3384.
- [47] YAN S, QIAN J, CAI C, et al. Spray method application of transdermal dsRNA delivery system for efficient gene silencing and pest control on soybean aphid *Aphis glycines* [J]. *Journal of Pest Science*, 2020, 93(1): 449-459.
- [48] DAS P R, SHERIF S M. Application of exogenous dsRNAs-induced RNAi in agriculture: challenges and triumphs[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2020, 11: 946.
- [49] MA Z Z, ZHOU H, WEI Y L, et al. A novel plasmid-*Escherichia coli* system produces large batch dsRNAs for insect gene silencing [J]. *Pest Management Science*, 2020, 76(7): 2505-2512.
- [50] MYSORE K, HAPAIRAI L K, WEI N, et al. Preparation and use of a yeast shRNA delivery system for gene silencing in mosquito larvae[J]. *Insect Genomics*, 2019, 1858: 213-231.
- [51] ZULFIQAR F, NAVARRO M, ASHRAF M, et al. Nanofertilizer use for sustainable agriculture: advantages and limitations[J]. *Plant Science*, 2019, 289: 110270.
- [52] DONG M, CHEN D, CHE L, et al. Biototoxicity evaluation of a cationic star polymer on a predatory ladybird and cooperative pest control by polymer-delivered pesticides and ladybird [J]. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 2022, 14(4): 6083-6092.
- [53] YAN S, LI N, GUO Y, et al. Chronic exposure to the star polycation (SPc) nanocarrier in the larval stage adversely impairs life history traits in *Drosophila melanogaster* [J]. *Journal of Nanobiotechnology*, 2022, 20(1): 515.
- [54] CHEN P J, SENTHILKUMAR R, JANE W N, et al. Transplastomic *Nicotiana benthamiana* plants expressing multiple defence genes encoding protease inhibitors and chitinase display broad-spectrum resistance against insects, pathogens and abiotic stresses[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2014, 12(4): 503-515.
- [55] YAN S, YIN H, LI N, et al. Combination of a nanocarrier delivery system with genetic manipulation further improves pesticide efficiency: a case study with chlorfenapyr[J]. *Environmental Science-Nano*, 2022, 9(6): 2020-2031.
- [56] LI M, MA Z, PENG M, et al. A gene and drug co-delivery application helps to solve the short life disadvantage of RNA drug [J]. *Nano Today*, 2022, 43: 101452.
- [57] WEI L Y, ZHANG L J, LIU N, et al. Effect of RNAi targeting *CYP6CY3* on the growth, development and insecticide susceptibility of *Aphis gossypii* by using nanocarrier-based transdermal dsRNA delivery system[J]. *Pesticide Biochemistry Physiology*, 2021, 177.
- [58] QU X, WANG S, LIN G, et al. The synergistic effect of thiamethoxam and synapsin dsRNA targets neurotransmission to induce mortality in *Aphis gossypii* [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(16): 9388.

(责任编辑:高蕾)