

◆ 专论:杀虫剂(特约稿) ◆

RNA杀虫剂研究进展

李琳红^{1,2},王海宝¹,梁沛^{1*}

(1.中国农业大学植物保护学院昆虫学系,北京 100193;2.中国农业大学三亚研究院,海南三亚 572025)

摘要:RNA生物农药是通过靶标生物体内天然存在的RNA干扰(RNA interference, RNAi)通路,干扰或抑制靶标生物特定基因转录或表达的多核苷酸制剂,是一种具有巨大开发及应用潜力的新型绿色的生物农药。首先介绍了dsRNA/siRNA、miRNA和piRNA这3种RNAi通路的作用机制,然后综述了dsRNA和miRNA生物农药在害虫防治领域的研究进展及其商品化进展,并总结了dsRNA和miRNA生物农药的异同点,最后分析了RNA生物农药在未来应用中可能遇到的问题,并提出了合理的建议。以期为RNA生物农药的研发与应用提供参考,为害虫的综合防控提供新的理念。

关键词:RNA 生物农药;RNA 干扰;双链 RNA;微小 RNA;害虫防治

中图分类号:TQ 450.1 文献标志码:A doi:10.3969/j.issn.1671-5284.2024.04.003

Research advances on RNA insecticides

LI Linhong^{1,2}, WANG Haibao¹, LIANG Pei^{1*}

(1. Department of Entomology, College of Plant Protection, China Agricultural University, Beijing 100193, China; 2. Sanya Institute of China Agricultural University, Hainan Sanya 572025, China)

Abstract: RNA biopesticides are polynucleotide preparations that inhibit the transcription or expression of specific genes in target organisms through naturally occurring RNA interference pathways, which is a new green biopesticide with enormous development and application potential. The mechanism of the three RNAi pathways, dsRNA/siRNA, miRNA, and piRNA were introduced in this paper. Then, the research progress and commercialization progress of dsRNA, miRNA biopesticides in the field of pest control, and the similarities and differences between dsRNA and miRNA biopesticides were summarized. Finally, the possible problems that might be encountered in the future application of RNA biopesticides were analyzed and reasonable suggestions were put forward. This review provided references for the research and application of RNA biopesticides, and offered new ideas for comprehensive pest control.

Key words: RNA biopesticide; RNA interference; double stranded RNA; microRNA; pest control

害虫种类繁多,危害极大,每年都造成巨大的经济损失。

目前,化学农药在害虫防治领域仍然发挥着重要的作用,然而害虫抗药性的发展不可避免地导致农药的用量和使用次数不断增加,进而带来农药残留超标、环境污染和害虫抗药性进一步加剧等一系列问题。因此,在农业生产实践中,需要不断研发绿色安全、高效的新型农药。

1 RNA生物农药

RNA生物农药又称核酸生物农药、核酸干扰素,通过靶标生物体内天然存在的RNA干扰(RNA interference, RNAi)通路,干扰或抑制靶标生物特定基因转录或表达的多核苷酸制剂^[1]。RNAi是真核生物中由RNA诱发,引起与之配对的mRNA高效特异性降解从而降低靶标基因表达的一种生物学现象,

收稿日期:2024-06-07

作者简介:李琳红(1991—),女,河南新密人,博士,主要从事昆虫毒理学方面的研究。E-mail:lilinhong2015@163.com

通信作者:梁沛(1970—),男,陕西凤翔人,教授,主要从事昆虫毒理学方面的研究。E-mail:liangcau@cau.edu.cn

在进化过程中高度保守。

RNAi主要由dsRNA/小干扰RNA(small interfering RNA, dsRNA/siRNA)、微小RNA(microRNA, miRNA)和P转座子诱导互作RNA(P-elementinduced

wimpy testis interacting RNA, piRNA)这3个通路调控^[2-4],详见图1。这些RNA的共同特点是在生物体内不表达蛋白质,而是在RNA水平上通过不同的通路行使各自的生物学功能。

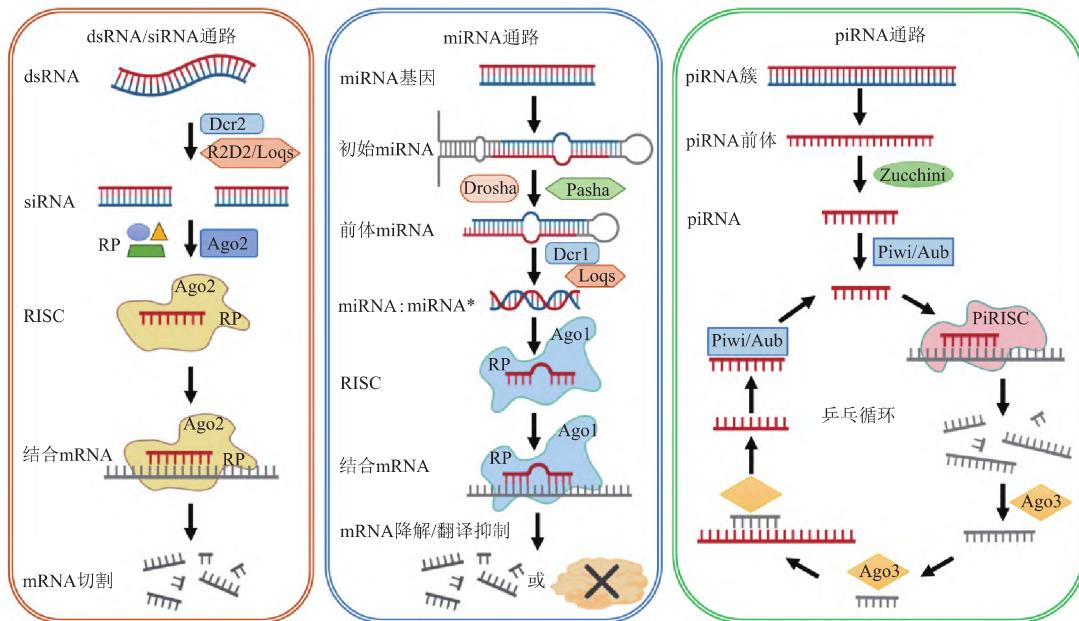


图1 RNA干扰的3种通路

2 RNAi不同通路的作用机制

2.1 DsRNA/siRNA通路

长链dsRNA在RNA聚合酶Ⅲ中Dicer2酶的作用下被切割为长度为9~21 nt的siRNA, siRNA在Dicer2及其协助蛋白R2D2的帮助下,将其传递给其他相关蛋白Argonaute(Ago2)等,最终形成“siRNA诱导的沉默复合体”(siRNA induced silencing complex, siRISC)^[5]。SiRNA在Ago2的作用下解离为2条单链,RISC被激活,通过碱基互补配对的原则识别靶标mRNA,由Ago2切割与靶标mRNA碱基互补的序列,从而导致靶标基因快速和持续性沉默^[6]。

2.2 MiRNA通路

微小RNA是一类长19~23 nt的内源性非编码单链RNA分子。绝大多数miRNA的转录是由RNA聚合酶Ⅱ介导,少数由RNA聚合酶Ⅲ介导,形成长度为几百甚至上千个碱基的初始转录本(pri-miRNA),在RNaseⅢ的作用下,pri-miRNA在细胞核中被剪切生成miRNA前体(pre-miRNA),然后由转运蛋白exopin-5从细胞核转运到细胞质中,进一步被Dicer酶切割成为双链(miRNA:miRNA*),即成熟的miRNA和其互补序列miRNA*。最终,成熟

的miRNA与其他相关蛋白包括TRBP和Argonaute蛋白(Ago1)等结合,形成“miRNA诱导的沉默复合体”(miRNA induced silencing complex, miRISC)^[7]。MiRISC在miRNA的引导下通过碱基互补配对原则识别靶标基因,并与之结合,对靶标基因进行特异性降解或抑制,进而调控基因的表达^[8-9]。

2.3 PiRNA通路

PiRNA是一类长度为26~31 nt的非编码RNA,最早在小鼠精巢里发现,因其主要与Piwi亚家族蛋白相互作用,所以被命名为piRNA^[10]。PiRNA与miRNA、siRNA虽然同属于一类成熟体序列长度小于200 nt的非编码RNA,但其与siRNA和miRNA又有不同之处:(1) PiRNA途径是动物所特有的,主要在生殖细胞中表达;(2) PiRNA形成成熟体的过程与Piwi亚家族蛋白(Ago3、Piwi、Aub)密切相关,而不依赖于Dicer酶的作用;(3)通过piRNA通路形成的piRNA在3'端有甲基化修饰,但piRNA的作用机制尚有待深入研究^[11]。

3 RNA生物农药在害虫防治领域的研究进展

RNA生物农药具有防治靶标范围广、应用方便、易于操作、绿色无污染、无残留及环境兼容性强

等众多优势,为研发新的绿色可持续害虫防治方法提供了新的机会,被称为“农药历史上的第3次革命”^[11-12]。RNAi在害虫防治方面的应用主要分为2种:(1)植物源保护剂(plant-incorporated protectant, PIP),通过转基因方法将具有杀虫活性的dsRNA/miRNA转入植物,进行害虫防治;(2)非植物源保护剂(non-plant-incorporated protectant, non-PIP),制备dsRNA/miRNA制剂,利用喷洒、灌根或浸种等方式进行害虫防治^[13]。在害虫防治领域,RNA生物农药的研究主要集中于dsRNA,miRNA生物农药的研究应用还处于起步阶段,而piRNA生物农药的研究几乎没有。因此,这里主要介绍dsRNA和miRNA生物农药在害虫防治领域的研究进展。

3.1 DsRNA生物农药的研究进展

3.1.1 DsRNA植物源保护剂在害虫防治领域的研究

植物源保护剂dsRNA在害虫防治方面的研究已有很多(表1)。表达玉米根萤叶甲*Diabrotica virgifera*的dsV-ATPaseA玉米能够显著抑制玉米根萤叶甲的生长发育,玉米根萤叶甲死亡率显著升高,转基因玉米植株的取食损伤显著降低^[14]。在棉花中表达棉铃虫*Helicoverpa armigera*细胞色素P450(CYP6AE14)

的发夹结构RNA(hairpin RNA,hpRNA),能大大降低棉铃虫幼虫对棉酚的耐受性,降低其存活率^[15];随后,dsRNA转基因作物防治害虫的案例越来越多,如表达*Chitin synthase 1 (CHS1)*的转基因小麦使麦长管蚜*Sitobion avenae*的死亡率升高46.7%~56.2%^[16];表达*β-actin*^[17]或*Dhc64C*^[18]的转基因烟草对烟粉虱*Bemisia tabaci*或桃蚜*Myzus persicae*也有很好的防效。转基因番茄中表达烟粉虱基因组中一个植物特异性水平转移基因*BtPMaT1*的dsRNA,导致烟粉虱最终死亡率几乎达到100%;此外,表达*BtPMaT1*基因的番茄还能有效减少烟粉虱的为害^[19]。二化螟*Chilo suppressalis*取食表达Fatty acyl-CoA reductase双链(dsFAR)的水稻后致死率在80%以上^[20]。除了一价的转基因抗虫植物,二价及多价的转基因抗虫植物的研究也有了新的进展,比如在表达苏云金杆菌(*Bacillus thuringiensis, Bt*)的*cry1Ca*水稻中转入靶向二化螟*p38*基因的dsRNA,能大大提高*cry1Ca*水稻对二化螟的抗性^[21]。最新研究发现,采用错配核苷酸间隔纠错的dsRNA设计理念,可以有效拓展植物介导RNAi技术的杀虫谱,从而达到“一箭双雕”的害虫防治模式^[22]。

表1 DsRNA植物源保护剂在害虫防治领域的研究

害虫	转基因植物	靶标基因	效果
玉米根萤叶甲 <i>Diabrotica virgifera</i>	玉米	V-ATPaseA	对玉米的取食损伤显著降低 ^[14]
棉铃虫 <i>Helicoverpa armigera</i>	棉花	CYP6AE14	降低棉铃虫幼虫对棉酚的耐受性及其存活率 ^[15]
麦长管蚜 <i>Sitobion avenae</i>	小麦	<i>Chitin synthase 1 (CHS1)</i>	死亡率升高46.7%~56.2% ^[16]
烟粉虱 <i>Bemisia tabaci</i>	烟草(核转效果优于质体)	<i>β-actin</i>	死亡率50.1%~82.3%,且繁殖力降低 ^[17]
桃蚜 <i>Myzus persicae</i>	烟草(转质体效果也很好)	<i>Dhc64C</i>	存活率降低,繁殖力受损 ^[18]
二化螟 <i>Chilo suppressalis</i>	水稻	Fatty acyl-CoA reductase (FAR)	害虫死亡率超过80% ^[20]
二化螟 <i>Chilo suppressalis</i>	<i>cry1Ca</i> 水稻	<i>p38</i>	<i>cry1Ca</i> 水稻转入 <i>dsp38</i> 后对二化螟的抗性增强 ^[21]
烟粉虱 <i>Bemisia tabaci</i> 、桃蚜 <i>Myzus persicae</i>	烟草	<i>β-actin</i>	表达一种中间序列dsRNA,同时防治桃蚜和烟粉虱 ^[22]
烟粉虱 <i>Bemisia tabaci</i>	番茄	plant-specific and horizontally transferred gene (<i>PMaT1</i>)	死亡率100.0% ^[19]

3.1.2 DsRNA非植物源保护剂在害虫防治领域的研究

基于dsRNA的RNA农药通过喷洒、灌根或浸种等方式在害虫防治领域同样具有很大的潜力(表2)。比如,体外合成*vATPase*的dsRNA,饲喂黑腹果蝇*Drosophila melanogaster*、赤拟谷盗*Tribolium castaneum*、豌豆长管蚜*Acyrtosiphon pisum*和烟草天蛾*Manduca sexta*后,害虫的死亡率为50.0%~

70.0%^[23]。为了降低dsRNA的生产成本,科研工作者通过HT115-L4440原核表达系统大量生产dsRNA,对马铃薯甲虫*Leptinotarsa decemlineata*同样具有良好的致死效果,该研究首次报道了细菌表达dsRNA诱发RNAi效应导致害虫的死亡^[24]。此后,该原核表达系统广泛应用于dsRNA生物农药的制备和防效检测中,比如德国小蠊*Blattella germanica*取食体外表达*dsα-tubulin*的死亡率达60%;东方粘虫*Mythimna*

*separata*取食ds*Chitinase1*和ds*Chitinase2*后虫重降低,死亡率升高10.8%~16.7%^[25-26]。也有研究发现,

pET28-HT115原核表达系统也能高效表达dsRNA,并用于害虫防治^[27-28]。

表2 DsRNA非植物源保护剂在害虫防治领域的研究

害虫	靶标基因	效果
黑腹果蝇 <i>Drosophila melanogaster</i> 、赤拟谷盗 <i>Tribolium castaneum</i> 、豌豆长管蚜 <i>Acyrtosiphon pisum</i> 、烟草天蛾 <i>Manduca sexta</i>	<i>vATPase</i>	死亡率50.0%~70.0% ^[23]
马铃薯甲虫 <i>Leptinotarsa decemlineata</i>	<i>β-actin</i> 、Protein transport protein <i>sec23</i> 、V-ATPase subunits B和E, <i>β-Coatomer subunit</i>	死亡率高, 体重降低 ^[24]
德国小蠊 <i>Blattella germanica</i>	<i>α-tubulin</i>	死亡率60.0% ^[25]
东方粘虫 <i>Mythimna separata</i>	<i>Chitinase1</i> 和 <i>Chitinase2</i>	死亡率提高10.8%~16.7%, 体重显著降低33.3%~46.5% ^[26]
异色瓢虫 <i>Harmonia axyridis</i>	<i>Vestigial (vg)</i>	翅畸形 ^[27]
桃蚜 <i>Myzus persicae</i>	V-ATPase subunits d 和 G	防效60.0%, 有效控制桃蚜种群数量 ^[28]
亚洲玉米螟 <i>Ostrinia furnacalis</i>	<i>Chitinase-like gene, CHT10</i>	蜕皮异常, 虫重降低, 死亡率100.0% ^[29]
埃及伊蚊 <i>Aedes aegypti</i>	<i>SNF7</i> 和 <i>SRC</i>	死亡率53.3%~75.0% ^[30]
桔小实蝇 <i>Bactrocera dorsalis</i> 、番石榴实蝇 <i>Bactrocera correcta</i>	epidermal growth factor receptor (EGFR)	死亡率33.3%~51.7% ^[31]
赤拟谷盗 <i>Tribolium castaneum</i>	<i>BiP</i> 、 <i>Armet</i>	死亡率75.0% ^[32]
甜菜夜蛾 <i>Spodoptera exigua</i>	<i>Chitin synthase B</i>	死亡率53.0% ^[33]
二化螟 <i>Chilo suppressalis</i>	<i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene (G3PDH)</i>	死亡率55.0% ^[34]
埃及伊蚊 <i>Aedes aegypti</i>	<i>IAP</i>	死亡率高于60.0% ^[35]
玉米螟 <i>Ostrinia furnacalis</i>	<i>dsNPFR</i> 和 <i>AMPK</i>	显著抑制幼虫进食、生长和发育 ^[36]
烟粉虱 <i>Bemisia tabaci</i>	<i>Ecdysone receptor (EcR)</i>	死亡率>80.0% ^[37]
大豆蚜 <i>Aphis glycines</i>	<i>Soluble trehalase (TREH)、V-type proton ATPase subunit D (ATPD) 和 E (ATPE)、Chitin synthase1 (CHS1)</i>	死亡率81.7% (dsATPD+dsATPE); 死亡率78.5% (dsATPD+dsCHS1) ^[38]
桃蚜 <i>Myzus persicae</i>	<i>hemocytin (hem)</i> 和苦参碱	见效快, 且持效期延长 ^[39]
棉蚜 <i>Aphis gossypii</i>	<i>CYP6CY13</i> 和吡虫啉	药后5 d的死亡率升高19.95% ^[40]
褐飞虱 <i>Nilaparvata lugens</i>	<i>CYP6ER1</i> 和吡虫啉	死亡率显著提高24%~54% ^[41]
棉铃虫 <i>Helicoverpa armigera</i>	<i>Chitinase (Chi)</i> 和灭虫脲	灭虫脲防效提高15.3%~24.0% ^[42]
白背飞虱 <i>Sogatella furcifera</i>	<i>hsc70-3</i> 和 <i>PP-α</i>	死亡率>60.0% ^[43]

随着研究的深入,发现传统的dsRNA递送系统会因为环境因素以及害虫体内环境的影响导致RNAi效率降低,而壳聚糖^[35]、脂质体^[44]和星状阳离子聚合物(SPC)^[36]等纳米颗粒递送dsRNA能大大提高RNAi效率。例如,与单独饲喂dsEcR相比,壳聚糖搭载dsEcR使烟粉虱死亡率高于80%^[37]; SPC可以携带dsRNA穿透大豆蚜*Aphis glycines*体壁,致死率可达78.5%^[38]; 田间试验中,SPC携带dsV-ATPase-d对桃蚜的防效达60.0%^[28]。

为了进一步减少化学杀虫剂的使用,同时提高对害虫的防效,越来越多的研究聚焦于杀虫剂、纳米载体和dsRNA的联合应用。苦参碱/SPC/dshem复合物的使用不仅加速了苦参碱对桃蚜的防效,还延长

了其持效期^[39]。与单独使用吡虫啉相比,RHMS/吡虫啉/dsCYP6CY13复合物对棉蚜*Aphis gossypii*的毒力显著提高了1.95倍^[40]; 吡虫啉/dsNiCYP6ER1@ZIF-8复合物使褐飞虱*Nilaparvata lugens*的死亡率显著升高了24%~54%^[41]。

3.2 MiRNA生物农药的研究进展

MiRNAs作为调节基因表达的关键因子,几乎参与昆虫所有生理和生化过程,包括蜕皮和变态^[45-46]、繁殖^[47]、免疫^[48-49]、翅的发育^[50]以及抗药性^[51-52],对昆虫的生长和发育至关重要。特定miRNAs的异常表达往往会使昆虫生长发育严重受阻,甚至导致死亡,这也暗示了miRNAs具有作为RNA生物农药防治害虫的潜能。然而,miRNA生物农药的研究进程远远

落后于dsRNA生物农药。

3.2.1 MiRNA植物源保护剂在害虫防治领域的研究

通过miRNA转基因植物来防治害虫的研究相对较少(表3)。2015年,Agrawal等^[53]研究发现,棉铃虫取食表达miR-24的烟草叶片后死亡率显著提高。在水稻中分别表达靶向二化螟蜕皮激素受体(ecdysone receptor, EcR)的miR-14和csu-novel-260,二化螟取食后存活率显著降低,水稻分蘖期的死

心率和抽穗期的白头率也大大降低^[54-55]。2021年,Yogindran等^[56]在番茄中表达amiRNA-HaEcR,结果表明,转基因番茄对棉铃虫表现出较高的抗性。中国农业大学研究团队分别构建表达了Pxy-miR-34转基因拟南芥和油菜,3种鳞翅目害虫取食后的死亡率为94.1%~100.0%^[56]。以上结果表明,通过构建miRNA转基因作物可用于防治害虫,甚至可以达到“一苗多防”的害虫防治模式。

表3 MiRNA植物源保护剂在害虫防治领域的研究

害虫	转基因植物	微小RNA	靶标基因	效果
棉铃虫 <i>Helicoverpa armigera</i>	烟草	miR-24	chitinase	死亡率提高0~50.0% ^[53]
二化螟 <i>Chilo suppressalis</i>	水稻	csu-novel-260	disembodied (dib)	二化螟死亡率显著升高;水稻白头率和死心率显著降低 ^[54]
二化螟 <i>Chilo suppressalis</i>	水稻	Csu-miR-14	Spook (Spo) 和 Ecdysone receptor (EcR)	二化螟死亡率高,发育缺陷;水稻存活率增加 ^[55]
棉铃虫 <i>Helicoverpa armigera</i>	番茄	ath-miR319a-HaEcR	Ecdysone receptor (EcR)	死亡率 43.0%~90.0% ^[57]

3.2.2 MiRNA非植物源保护剂在害虫防治领域的研究

MiRNA非植物源保护剂在害虫防治领域的研究也有了一定的进展(表4)。2016年,Yogindran等^[58]以斜纹夜蛾*Spodoptera litura*内源miRNA(let-7)为骨架表达靶向棉铃虫EcR的dsRNA(amiRNA-HaEcR),棉铃虫取食amiRNA-HaEcR后死亡率明显升高,繁

殖能力大大降低。该研究虽然没有直接表达昆虫内源miRNA,但是为后续内源miRNA的体外表达提供了借鉴。2022年,埃及伊蚊*Aedes aegypti*的miR-8和miR-375在白僵菌*Beauveria bassiana*中成功表达,该白僵菌对埃及伊蚊的致病力明显增强,并加速了埃及伊蚊的死亡,这种基于病原体的RNAi为真菌杀虫剂防效的提高提供了一种新的策略^[59]。

表4 MiRNA非植物源保护剂在害虫防治领域的研究

害虫	微小RNA	靶标基因	效果
棉铃虫 <i>Helicoverpa armigera</i>	let-7a-HaEcR	Ecdysone receptor (EcR)	死亡率 50.0% ^[58]
埃及伊蚊 <i>Aedes aegypti</i>	aae-miR-8、aae-miR-375	Toll immune response gene	表达miRNA的白僵菌对伊蚊的致病力显著提高 ^[59]
棉铃虫 <i>Helicoverpa armigera</i> 、甜菜夜蛾 <i>Spodoptera exigua</i> 、小菜蛾 <i>Plutella xylostella</i>	miR-34-5p	Ecdysone receptor (EcR)	校正死亡率为 31.7%~78.8%, 显著降低繁殖力 32.9%~90.7% ^[60]
白蚁 <i>Reticulitermes chinensis</i>	miR-715-p	免疫反应和氧化还原反应相关基因	过表达miR-715-p使真菌感染的白蚁死亡率显著升高 ^[61]

中国农业大学对miRNA生物农药也进行了系列的研究,结果表明,鳞翅目害虫棉铃虫、甜菜夜蛾*Spodoptera exigua*和小菜蛾*Plutella xylostella*取食miR-34-5p的类似物agomir-34和抑制剂antagomir-34后累积校正死亡率分别为31.7%~63.6%和44.1%~75.6%,繁殖力显著降低了32.9%~43.8%和38.4%~47.6%^[60]。并通过原核系统表达了小菜蛾内源miR-34-5p(amiR-34),3种鳞翅目害虫取食amiR-34喷雾处理盆栽小白菜和玉米后,幼虫死亡率为81.7%~90.8%^[62]。这也是首次实现了利用一种害虫的内源miRNA同时防治多种鳞翅目害虫的“一药多防”绿

色害虫防治模式。这为进一步发展基于miRNA的绿色害虫控制策略奠定了重要基础。

4 RNA生物农药的商品化进展

RNA生物农药在害虫防治领域的商品化应用同样包括植物源和非植物源保护剂,目前均有商品化产品。在植物源保护剂方面,孟山都公司(现拜耳)的新一代转基因玉米MON87411同时表达了Bt蛋白Cry3Bb1、耐除草剂基因CP4-EPSPS和靶向玉米根萤叶甲*Snf7*的dsRNA,该玉米2017年获得美国环境保护署(US Environmental Protection Agency,

EPA)的批准,随后在阿根廷、巴西、加拿大和美国获得种植许可^[63-64]。MON87411是国际上首例在植物中表达dsRNA的产品^[65]。2021年1月21日,拜耳宣布该产品获得中国农业农村部颁发的转基因生物安全证书,2022年在美国进行商业化种植,2023年在加拿大进行推广^[66]。2021年2月9日,澳新食品标准局(Food Standards Australia New Zealand,FSANZ)批准美国科迪华公司的抗虫和耐除草剂玉米产品DP23211用于食品,该玉米同时表达靶向玉米根萤叶甲DvSSJ1基因的dsRNA和IPD072Aa蛋白,能有效防治玉米根萤叶甲^[66]。

令人兴奋的是用于害虫防治的喷洒型RNA生物农药ledprona于2023年12月22日获得了EPA的正式批准。Ledprona是美国GreenLight Biosciences公司开发的靶向马铃薯甲虫蛋白酶体β5亚基(PSMB5)的dsRNA杀虫剂,主要活性成分是dsPSMB5,通过抑制PSMB5的表达来防治害虫。使用0.8%的dsPSMB5制剂处理马铃薯甲虫2龄幼虫,药后6 d致死率高达90%,且dsRNA用量仅需4 g/hm²。这是世界上第1个商业化的喷洒型dsRNA生物农药(<https://www.epa.gov/pesticides/epa-registers-novel-pesticide-technology-potato-crops>)。此外,上海硅羿科技有限公司获得了国内最早颁发的4张RNA生物农药“核酸干扰素”命名函,其中研发的第一个烟草花叶病毒核酸干扰素SG-RNA001已正式进入农药登记田间试验阶段,杀虫剂、种衣剂也在陆续申请中。RNAissance Ag LLC也在积极开发针对小菜蛾的喷雾式RNA生物农药。

目前,RNA生物农药在害虫防治领域的商品化有了很大的突破,但是到目前为止RNA生物农药的产品主要是基于dsRNA,miRNA相关的生物农药还没有商品化产品。这主要是miRNA用于害虫防治的研究起步较晚,但是近2年miRNA已经陆续进入大家的视野,相信在不久的将来就会有miRNA生物农药产品的出现。

5 DsRNA和miRNA生物农药的异同点

DsRNA和miRNA生物农药的相同点:(1)DsRNA和miRNA均是非编码RNA,在生物体内不表达蛋白质,都通过负调控靶标基因的表达来防治害虫。(2)都可以通过植物源保护剂和非植物源保护剂这2种方式用于害虫防控。

DsRNA和miRNA生物农药的不同点,表现在6个方面。

(1)来源不同:DsRNA生物农药是利用害虫靶标

基因人为设计200~500 nt的RNA序列,并不是害虫内源基因;而miRNA生物农药是利用害虫内源性的、对其生长发育十分关键的miRNA来防治害虫。

(2)作用效果不同:一般来说,1种dsRNA只能调控1个靶标基因的表达,且具有物种特异性;而miRNA对靶标基因的调控十分复杂,单个miRNA可以调控数百个不同基因的表达,1个靶标基因也可能受到多个miRNA的共同调控^[67-68]。

(3)害虫防治谱不同:DsRNA生物农药一般是“一药一防”;而miRNA生物农药对害虫的防治具有广谱性,能实现1种miRNA同时防治多种害虫的“一药多防”的害虫防治模式^[69]。

(4)研究进展不同:DsRNA生物农药的研究更加深入,目前已经拥有了商业化产品,如转基因玉米MON87411、DP23211,以及喷洒型dsRNA生物农药ledprona;MiRNA的相关研究大多集中在其功能上,miRNA作为生物农药的研究在近几年才得到广大学者的重视,所以到目前为止还没有商品化的miRNA生物农药。

(5)脱靶效应:外源dsRNA进入害虫体内先降解产生siRNA,而siRNA的序列不确定,可能导致脱靶效应,且这种脱靶效应很难预测。MiRNA本身序列较短,因此不存在这方面风险。

(6)抗药性:DsRNA易产生靶标抗性,miRNA产生靶标抗性的几率更低,如参考文献[58]所述,昆虫不会明确地选择对其内源性miRNA产生抗药性。然而因靶器官(主要是肠道)细胞对RNA吸收能力的改变而产生的抗性,dsRNA与miRNA应该无太大差别。

6 结论与展望

RNA生物农药具有防治靶标范围广,开发成本低,绿色安全等众多优势,有望实现农产品质量安全、生态安全和环境安全等各种需求,非常符合当今社会的要求,是一种具有巨大开发及应用潜力的新型绿色生物农药^[1]。目前,已拥有商品化产品转基因玉米MON87411和DP23211,以及喷洒型dsRNA生物农药ledprona。然而,为了确保RNA生物农药的可持续研发与应用,还必须解决好以下2个关键的问题。

6.1 害虫对RNA生物农药的抗性

在害虫防治领域,尽管RNA生物农药相对于传统化学农药和转基因Bt(*Bacillus thuringiensis*)作物拥有其自身独特的优势,然而,不可否认的是,与化

学农药和转基因Bt作物一样,害虫超强的适应能力使其仍有可能对RNA生物农药产生抗药性。害虫对RNA生物农药产生抗性的方式有2种:(1)RNAi中靶标基因的表达量下调或突变;(2)靶器官(主要是肠道)细胞对RNA的吸收效率降低^[69]。此前已有报道,玉米根萤叶甲^[70]、马铃薯甲虫^[71]和林业害虫柳蓝叶甲*Plagiodesma versicolora*^[72]均在实验室条件下通过dsRNA的持续筛选,对dsRNA抗性显著增加。与敏感品系相比,抗性品系肠道组织对dsRNA的吸收能力显著降低。因此,在实际应用过程中,RNA生物农药最好与其他害虫防治手段(如化学杀虫剂或生物杀虫剂)联合使用,这种多策略联合使用的方法不但可以提高对害虫的防治效果,还能降低杀虫剂对害虫的选择压,从而降低抗性发展的风险。

6.2 RNA生物农药的脱靶效应

RNA生物农药如果存在脱靶效应,可能会对传粉昆虫和天敌昆虫等有益昆虫造成潜在的威胁,同样会限制其在害虫防治中的应用。因此,在RNA生物农药的研发初期就要严格把关,严格规避潜在的脱靶效应。首先,对于dsRNA来说,设计初期要进行深入的、系统的生物信息学分析,设计高度特异和保守的dsRNA,同时还应考虑dsRNA降解为siRNA造成的脱靶效应,从而避免其对非靶标物种的危害;对于miRNA来说,要严格筛选昆虫特有的miRNA,并通过miRNA靶标预测软件全面系统地预测其靶标结合位点,筛选掉可能靶向有益昆虫或哺乳动物重要基因的miRNA。其次,在RNA生物农药毒力检测过程中,也要检测其对非靶标生物的毒力,进而为RNA生物农药的实际应用奠定良好的基础并提供保障。

参考文献

- [1] 张文庆,王桂荣. RNA干扰:从基因功能到生物农药[M]. 北京:科学出版社, 2021: 5-6.
- [2] ZHU K Y, PALLI S R. Mechanisms, applications, and challenges of insect RNA interference[J]. Annu Rev Entomol, 2020, 65: 293-311.
- [3] HAN B W, WANG W, LI C, et al. Noncoding RNA. piRNA-guided transposon cleavage initiates Zucchini-dependent, phased piRNA production[J]. Science, 2015, 348(6236): 817-821.
- [4] PALAZZO A F, LEE E S. Non-coding RNA: what is functional and what is junk?[J]. Front Genet, 2015, 6: 2.
- [5] LIU X, JIANG F, KALIDAS S, et al. Dicer-2 and R2D2 coordinately bind siRNA to promote assembly of the siRISC complexes[J]. RNA, 2006, 12(8):1514-1520.
- [6] LIU Y, YE X, JIANG F, et al. C3PO, an endoribonuclease that promotes RNAi by facilitating RISC activation[J]. Science, 2009, 325(5941): 750-753.
- [7] HE L, HANNON G J. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation[J]. Nat Rev Genet, 2004, 5(7): 522-531.
- [8] GHILDIYAL M, XU J, SEITZ H, et al. Sorting of *Drosophila* small silencing RNAs partitions microRNA* strands into the RNA interference pathway[J]. RNA, 2010, 16(1): 43-56.
- [9] HUSSAIN M, ASGARI S. MicroRNAs as mediators of insect host-pathogen interactions and immunity[J]. Journal of Insect Physiology, 2014, 70: 151-158.
- [10] ARAVIN A, GAIDATZIS D, PFEFFER S, et al. A novel class of small RNAs bind to MILI protein in mouse testes[J]. Nature, 2006, 442(7099): 203-207.
- [11] CHRISTIAENS O, NIU J, NJI TIZI TANING C. RNAi in insects: a revolution in fundamental research and pest control applications[J]. Insects, 2020, 11(7): 415.
- [12] ANDRADE E C, HUNTER W B. RNA interference-natural gene-based technology for highly specific pest control (HiSPeC)[J]. Agricultural and Food Science, 2016, 25(4): 391-409.
- [13] ZOTTI, DOS SANTOS E A, 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.
- [14] BAUM J A, BOGAERT T, CLINTON W, et al. Control of coleopteran insect pests through RNA interference[J]. Nat Biotechnol, 2007, 25(11): 1322-1326.
- [15] 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]. Nat Biotechnol, 2007, 25(11): 1307-1313.
- [16] ZHAO Y, SUI X, XU L, et al. Plant-mediated RNAi of grain aphid CHS1 gene confers common wheat resistance against aphids [J]. Pest Manag Sci, 2018, 74(12): 2754-2760.
- [17] DONG Y, YANG Y, WANG Z, et al. Inaccessibility to double-stranded RNAs in plastids restricts RNA interference in *Bemisia tabaci* (whitefly)[J]. Pest Management Science, 2020, 76 (9): 3168-3176.
- [18] DONG Y, WU M, ZHANG Q, et al. Control of a sap-sucking insect pest by plastid-mediated RNA interference[J]. Molecular Plant, 2022, 15(7): 1176-1191.
- [19] XIA J, GUO Z, YANG Z, et al. Whitefly hijacks a plant detoxification gene that neutralizes plant toxins[J]. Cell, 2021, 184 (7): 1693-1705.
- [20] SUN Y, GONG Y, HE Q, et al. FAR knockout significantly inhibits *Chilo suppressalis* survival and transgene expression of double-stranded FAR in rice exhibits strong pest resistance[J]. Plant Biotechnol J, 2022, 20(12): 2272-2283.
- [21] WU Y, WENG Z, YAN H, et al. The microRNA-7322-5p/p38/Hsp19

- axis modulates *Chilo suppressalis* cell-defences against Cry1Ca: an effective target for a stacked transgenic rice approach [J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2023, 21(9): 1827-1838.
- [22] DONG Y, ZHANG Q, MAO Y, et al. Control of two insect pests by expression of a mismatch corrected double-stranded RNA in plants [J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2024, 23: 1-10.
- [23] WHYARD S, SINGH A D, WONG S. Ingested double-stranded RNAs can act as species-specific insecticides[J]. *Insect Biochem Mol Biol*, 2009, 39(11): 824-832.
- [24] ZHU F, XU J, PALLI R, et al. Ingested RNA interference for managing the populations of the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*[J]. *Pest Management Science*, 2011, 67 (2): 175-182.
- [25] 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*, 2016, 73(5): 960-966.
- [26] GANBAATAR O, CAO B, ZHANG Y, et al. Knockdown of *Mythimna separata* chitinase genes via bacterial expression and oral delivery of RNAi effectors[J]. *BMC Biotechnol*, 2017, 17(1): 9.
- [27] 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.
- [28] 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]. *Journal of Pest Science*, 2022, 96: 181-193.
- [29] HE B, CHU Y, YIN M, et al. Fluorescent nanoparticle delivered dsRNA toward genetic control of insect pests[J]. *Adv Mater*, 2013, 25(33): 4580-4584.
- [30] DAS S, DEBNATH N, CUI Y, et al. Chitosan, carbon quantum dot, and silica nanoparticle mediated dsrna delivery for gene silencing in *Aedes aegypti*: a comparative analysis[J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2015, 7(35): 19530-19535.
- [31] GUO S, ZHAO Z, LIU L, et al. Comparative transcriptome analyses uncover key candidate genes mediating flight capacity in *Bactrocera dorsalis* (Hendel) and *Bactrocera correcta* (Bezzi) (Diptera: Tephritidae)[J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(2): 578-584.
- [32] AVILA L A, CHANDRASEKAR R, WILKINSON K E, et al. Delivery of lethal dsRNAs in insect diets by branched amphiphilic peptide capsules[J]. *J Control Release*, 2018, 273: 139-146.
- [33] 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]. *Front Physiol*, 2018, 9: 316.
- [34] WANG K, PENG Y, CHEN J, et al. Comparison of efficacy of RNAi mediated by various nanoparticles in the rice striped stem borer (*Chilo suppressalis*)[J]. *Pestic Biochem Physiol*, 2020, 165: 104467.
- [35] DHANDAPANI R K, GURUSAMY D, HOWELL J L, et al. Development of CS-TPP-dsRNA nanoparticles to enhance RNAi efficiency in the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*[J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 8775.
- [36] ZHAO J, YAN S, LI M, et al. NPFR regulates the synthesis and metabolism of lipids and glycogen via AMPK: novel targets for efficient corn borer management[J]. *Int J Biol Macromol*, 2023, 247: 125816.
- [37] KEPPANAN R, KARUPPANNASAMY A, NAGARAJA B C, et al. Effectiveness of chitosan nanohydrogel mediated encapsulation of *EcR* dsRNA against the whitefly, *Bemisia tabaci* Asia-I (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae)[J]. *Pestic Biochem Physiol*, 2024, 198: 105712.
- [38] 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*, 2019, 93(1): 449-459.
- [39] 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.
- [40] LV H, LI X, LI J, et al. Overcoming resistance in insect pest with a nanoparticle-mediated dsRNA and insecticide co-delivery system [J]. *Chemical Engineering Journal*, 2023, 475: 146239.
- [41] YU C, LI J, ZHANG Z, et al. Metal-organic framework-based insecticide and dsRNA codelivery system for insecticide resistance management[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2023, 15 (41): 48459-48505.
- [42] CHU D, XU S, LI X, et al. Combination of diflubenzuron and RNAi technology to improve the control effect of *Helicoverpa armigera*[J]. *Entomologia Generalis*, 2023.
- [43] MA Y F, LIU T T, ZHAO Y Q, et al. RNA interference-screening of potentially lethal gene targets in the white-backed planthopper *Sogatella furcifera* via a spray-induced and nanocarrier-delivered gene silencing system[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2024, 72(2): 1007-1016.
- [44] 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 Manag Sci*, 2017, 73(5): 960-966.
- [45] LIM D H, LEE S, HAN J Y, et al. Ecdysone-responsive microRNA-252-5p controls the cell cycle by targeting Abi in *Drosophila*[J]. *The FASEB journal*, 2018, 32(8): 4519-4533.
- [46] SONG J, ZHOU S. Post-transcriptional regulation of insect metamorphosis and oogenesis [J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2020, 77(10): 1893-1909.

- [47] SONG J, LI W, ZHAO H, et al. Clustered *miR-2*, *miR-13a*, *miR-13b* and *miR-71* coordinately target *Notch* gene to regulate oogenesis of the migratory locust *Locusta migratoria*[J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2019, 106: 39-46.
- [48] FULLAONDO A, LEE S Y. Identification of putative miRNA involved in *Drosophila melanogaster* immune response[J]. Dev Comp Immunol, 2012, 36(2): 267-273.
- [49] WANG C, GUO X, LI Y, et al. *MiR-34-5p*, encoded by *Spodoptera frugiperda*, participates in anti-baculovirus by regulating innate immunity in the insect host[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2022, 222(B): 2190-2199.
- [50] SHANG F, NIU J, DING B Y, et al. The *miR-9b* microRNA mediates dimorphism and development of wing in aphids[J]. Proc Natl Acad Sci, 2020, 117(15): 8404-8409.
- [51] ZHU B, LI L, WEI R, et al. Regulation of *GStu1*-mediated insecticide resistance in *Plutella xylostella* by miRNA and lncRNA [J]. Plos Genetics, 2021, 17(10): e1009888.
- [52] ZHU B, SUN X, NIE X, et al. MicroRNA-998-3p contributes to Cry1Ac-resistance by targeting ABCC2 in lepidopteran insects[J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2020, 117: 103283.
- [53] AGRAWAL A, RAJAMANI V, REDDY V S, et al. Transgenic plants over-expressing insect-specific microRNA acquire insecticidal activity against *Helicoverpa armigera*: an alternative to *Bt*-toxin technology[J]. Transgenic Res, 2015, 24(5): 791-801.
- [54] ZHENG X, WENG Z, LI H, et al. Transgenic rice overexpressing insect endogenous microRNA *csu-novel-260* is resistant to striped stem borer under field conditions[J]. Plant Biotechnology Journal, 2020, 19(3): 421-423.
- [55] HE K, XIAO H, SUN Y, et al. Transgenic microRNA-14 rice shows high resistance to rice stem borer[J]. Plant Biotechnology Journal, 2019, 17(2): 461-471.
- [56] LI L H, GUO T X, ZHU B, et al. Host plants expressing *pxy-miR-34-5p* demonstrate high efficacy against multiple lepidopterous pests[J]. Entomologia Generalis, 2024, 44(3): 613-619.
- [57] YOGINDRAN S, RAJAM M V. Host-derived artificial miRNA-mediated silencing of ecdysone receptor gene provides enhanced resistance to *Helicoverpa armigera* in tomato[J]. Genomics, 2021, 113(2): 736-747.
- [58] YOGINDRAN S, RAJAM M V. Artificial miRNA-mediated silencing of ecdysone receptor (*EcR*) affects larval development and oogenesis in *Helicoverpa armigera*[J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2016, 77: 21-30.
- [59] CUI C, WANG Y, LI Y, et al. Expression of mosquito miRNAs in entomopathogenic fungus induces pathogen-mediated host RNA interference and increases fungal efficacy[J]. Cell Reports, 2022, 41(4): 111527.
- [60] LI L H, ZHU B, SUN X, et al. *MiR-34-5p*, a novel molecular target against lepidopteran pests[J]. Journal of Pest Science, 2022, 96: 209-224.
- [61] LIU L, YAN F M, ZHAO C C, et al. MicroRNAs shape social immunity: a potential target for biological control of the termite *Reticulitermes chinensis*[J]. Journal of Pest Science, 2023, 96(7): 265-279.
- [62] LI L H, SHI D D, YAN J C, et al. In-vitro-expressed *pxy-mir-34* shows high toxicity to multiple lepidopteran pests[J]. Entomologia Generalis, 2024, 44(3): 583-590.
- [63] ORGANISMS E P O G M, NAEGELI H, BIRCH A N, et al. Assessment of genetically modified maize MON 87411 for food and feed uses, import and processing, under Regulation (EC) No 1829/2003 (application EFSA-GMO-NL-2015-124)[J]. EFSA J, 2018, 16(6): e05310.
- [64] PAPADOPOULOU N, DEVOS Y, ALVAREZ-ALFAGEME F, et al. Risk assessment considerations for genetically modified RNAi plants: EFSA's activities and perspective [J]. Front Plant Sci, 2020, 11: 445.
- [65] 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(9): 1883-1899.
- [66] 关若冰, 李海超, 苗雪霞. RNA生物农药的商业化现状及存在问题[J]. 中国农业科学, 2022, 55(15): 2949-2960.
- [67] LEGEAI F, RIZK G, WALSH T, et al. Bioinformatic prediction, deep sequencing of microRNAs and expression analysis during phenotypic plasticity in the pea aphid, *Acyrthosiphon pisum*[J]. BMC Genomics, 2010, 11: 281.
- [68] HE K, XIAO H, SUN Y, et al. microRNA-14 as an efficient suppressor to switch off ecdysone production after ecdysis in insects[J]. RNA Biol, 2019, 16(9): 1313-1325.
- [69] YOON J S, SHUKLA J N, GONG Z J, et al. RNA interference in the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*: identification of key contributors[J]. Insect Biochem Mol Biol, 2016, 78: 78-88.
- [70] KHAJURIA C, IVASHUTA S, WIGGINS E, et al. Development and characterization of the first dsRNA-resistant insect population from western corn rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte[J]. PLoS One, 2018, 13(5): e0197059.
- [71] MISHRA S, DEE J, MOAR W, et al. Selection for high levels of resistance to double-stranded RNA (dsRNA) in Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata* Say) using non-transgenic foliar delivery[J]. Sci Rep, 2021, 11(1): 6523.
- [72] LIAO C, ZHANG M, ZHANG J. Characterization and potential mechanism of resistance to double-stranded RNA in willow leaf beetle, *Plagiodera versicolora*[J]. Journal of Pest Science, 2024, 97(2): 017643.

(编辑:顾林玲)