



RNAi 在害虫防治中应用的重要进展及存在问题

胡少茹^{1,2}, 关若冰¹, 李海超¹, 苗雪霞^{1,*}

(1. 中国科学院上海生命科学研究院植物生理生态研究所, 昆虫发育与进化生物学重点实验室, 上海 200032;

2. 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要: RNAi 是目前最有可能应用于害虫绿色防控的新技术。2017 年 6 月, 美国环境署(EPA)批准了国际上第一例表达昆虫双链 RNA(dsRNA)的抗虫转基因玉米 MON87411, 掀起了利用 RNAi 技术进行害虫防治研究新的热潮。但是, 目前 RNAi 在害虫防治中的应用还存在一些问题, 例如有效靶标基因筛选和应用策略, 鳞翅目昆虫对 RNAi 的敏感性以及双链 RNA 在环境中的稳定性等等。本文系统总结了 RNA 干扰现象发现 20 年来, 该技术在害虫防治领域的研究及应用概况, 并对 RNAi 技术应用的可行性、应用方法、存在问题和目前的一些解决办法进行了比较详细的综述。通过对近期研究结果的综合分析发现, dsRNA 进入某些鳞翅目昆虫中肠或血淋巴后, 被相关核酸酶降解可能是其 RNAi 效率较低的首要原因。通过对 dsRNA 进行脂质体修饰, 纳米粒子包埋可以在一定程度上解决 dsRNA 降解的问题, 进而提高 RNAi 效率。

关键词: RNA 干扰; 害虫防治; 基因功能; 双链 RNA; 脂质体; 纳米粒子

中图分类号: Q966 **文献标识码:** A **文章编号:** 0454-6296(2019)04-0506-10

Application of RNAi in insect pest management: important progress and problems

HU Shao-Ru^{1,2}, GUAN Ruo-Bing¹, LI Hai-Chao¹, MIAO Xue-Xia^{1,*} (1. Key Laboratory of Insect Developmental and Evolutionary Biology, Institute of Plant Physiology and Ecology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032, China; 2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: RNAi is regarded as a green pest control strategy most likely to be applied in insect pest control. In June 2017, United States Environmental Protection Agency (EPA) approved the first transgenic insect-resistant maize MON87411 expressing insect double-stranded RNA (dsRNA) in the world, and this brought a new upsurge of research of using RNAi technology in insect pest management. However, there are still some problems to be addressed in the application of RNAi technology in pest control, *e. g.*, screening and application strategies of effective target genes, the sensitivity of lepidopteran insects to RNAi, the stability of dsRNA in environment, *etc.* In this article, we summarized the research and application of RNAi technology in relation to pest control over the past two decades. We also reviewed the feasibility, application methods, existing problems and some current solutions of RNAi technology. We found that the degradation of dsRNA in the midgut or hemolymph of some lepidopteran insects may be the primary reason of the low RNAi efficiency through a comprehensive analysis of recent research results. Through dsRNA modification or embedding by liposome or nanoparticle, it is possible to

基金项目: 国家重点研发计划课题(2017YFD0200905); 国家“973”计划项目(2015CB755703); 国家自然科学基金项目(31672354, 31772520, 31702057)

作者简介: 胡少茹, 女, 1992 年 12 月生, 河南商丘人, 博士研究生, 研究方向为害虫防治, E-mail: srhu@sibs.ac.cn

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: xxm@sippe.ac.cn

收稿日期 Received: 2018-11-26; 接受日期 Accepted: 2019-01-19

solve the problem of dsRNA degradation to a certain extent, thus improving the RNAi efficiency.

Key words: RNAi; pest control; gene function; dsRNA; liposome; nanoparticle

RNA 干扰(RNA interference, RNAi)是 Fire 等人于 1998 年发现的,他们在秀丽隐杆线虫 *Caenorhabditis elegans* 中证明了 dsRNA 能够引起基因沉默效果,并将这种现象命名为 RNAi (Fire *et al.*, 1998)。当 dsRNA 进入宿主细胞后,会被细胞内的核酸内切酶 Dicer 剪切成小干扰 RNA (siRNA), siRNA 再与体内一些酶结合形成 RNA 诱导的沉默复合物(RNA-induced silencing complex, RISC),随后经过一系列作用,与特定 mRNA 结合,并引起靶标基因功能沉默(Tijsterman and Plasterk 2004; 崔世权等, 2017)。

RNAi 的发现促进了昆虫基因功能和基因调控方面的研究,尤其是对非模式昆虫基因功能的研究发挥了十分重大的推动作用。RNAi 能够简单、便捷地降低靶标基因的表达,并且不会完全清除目标基因的信使 RNA,因此,更容易根据昆虫表型变化对目标基因进行功能分析(Bernstein *et al.*, 2001; Bartel, 2004)。

RNAi 除了可以作为昆虫基因功能研究的重要技术手段外,也是目前最有可能应用于害虫防治的新技术。目前害虫防治的主要手段依旧是以化学农药为主,由于其持续使用,害虫逐渐产生抗性。昆虫对杀虫剂产生抗药性的主要方式有两种:昆虫的解毒能力增强以及对杀虫剂靶标位点的敏感性降低。利用 RNAi 技术,我们可以筛选并干扰昆虫抗药性相关的关键基因,解决昆虫对杀虫剂的抗药性问题(Guan *et al.*, 2017)。此外,我们还可以通过 RNA 干扰的方式,筛选可以作为害虫防治的靶标基因直接应用于害虫防治。

近年来,有多篇综述从不同角度对 RNAi 在植物抗虫及害虫防治领域的研究和应用情况进行了总结(Huvenne and Smagghe, 2010; Zhang H *et al.*, 2013; Christiaens and Smagghe, 2014; Joga *et al.*, 2016; 冯小艳和张树珍, 2017; Zhang J *et al.*, 2017; Niu *et al.*, 2018; Zotti *et al.*, 2018)。其中,Joga 等(2016)总结了影响 RNAi 机理的因素、dsRNA 的系统性及可用于 dsRNA 传递的新方法等,并对提高 RNAi 效率的方法进行了介绍;Zhang 等(2017)总结了植物介导的 RNAi 在作物保护方面的巨大应用潜力,尤其是在叶绿体中表达 dsRNA 的一些特点和优势;Zotti 等(2018)系统而简要地总结了近 20 年

来 RNAi 在农业病虫草螨及线虫防治中的研究及应用概况。本文对近年来 RNAi 在害虫防治中的重要进展、存在问题及目前的一些解决办法进行了系统的总结,期望为利用该技术进行害虫防治和基因功能研究提供参考。

1 RNAi 在农业害虫防治中应用的可行性分析及研究现状

抑制昆虫生长发育过程中重要基因的表达,可以导致昆虫发育畸形甚至死亡(Bettencourt *et al.*, 2002; Whitten *et al.*, 2016)。根据 RNAi 的这一特性,启发昆虫学工作者将 RNAi 技术应用于害虫防治的探索。通过多年的研究,已经对 RNAi 应用于害虫防治的可行性、应用方式、存在问题等进行了大量的探索,取得一些重要进展。

1.1 RNAi 应用于害虫防治的可行性探索

RNAi 技术出现后,很多研究组开始将其应用于害虫防治的研究。Bettencourt 等(2002)最早将该技术应用于鳞翅目昆虫的研究,在惜古比天蚕蛾 *Hyalophora cecropia* 的蛹期注射抑制血细胞凝集素基因 *Hemolin* 的 dsRNA,导致下一代胚胎畸形和死亡。此后,昆虫学研究人员一直在利用 RNAi 技术在不同种类的昆虫中进行尝试,并取得了一些有价值的证据(请参见其他综述 Zhang *et al.*, 2017; Niu *et al.*, 2018; Zotti *et al.*, 2018)。最新的研究表明,通过 RNAi 的方式降低灰飞虱 *Laodelphax striatellus* 节律行为相关 *tim* 基因的表达量,导致灰飞虱成虫昼夜节律紊乱(Jiang *et al.*, 2018)。Santos-Ortega 和 Killiny(2018)对柑橘木虱 *Diaphorina citri* 蔗糖水解酶同系物基因 *DcSuh* 进行了鉴定并通过 RNAi 技术对其功能进行分析。他们分别将不同剂量的 dsDcSuh 注射到木虱体内,结果发现 100 ng 的 dsRNA 就能引起木虱幼虫死亡,在 dsRNA 处理后的幼虫体内检测到蔗糖水解酶活性降低,而成虫则出现了腹水症的现象。Deng 等(2018)合成了胰岛素受体基因 *Ldchico* 的 dsRNA,将马铃薯 *Solanum tuberosum* 叶片在 dsRNA 悬液中浸泡后饲喂幼虫,发现幼虫体内 *Ldchico* 基因表达量下降的同时,还出现了生长发育迟缓的现象。Ellango 等(2018)检测了小菜蛾 *Plutella xylostella* 酪氨酸羟化酶(tyrosine

hydroxylase, TH) 基因作为 RNAi 靶基因的潜力。他们将 dsRNA 涂抹到卷心菜 *Brassica oleracea* 叶片上, 让小菜蛾幼虫取食。结果发现, 取食 dsRNA 后, 幼虫体内靶基因转录水平明显降低, 幼虫死亡率大大提高。

这些最新的研究结果均表明, 抑制昆虫生长发育过程中重要基因的表达, 可以引起昆虫生长发育障碍或者死亡, 说明 RNAi 能够作为新型防治方法应用于害虫防治。

1.2 RNAi 在害虫防治中的应用方法简便易行

RNAi 技术在害虫防治中的应用方法简单、便捷。通过 10 多年的探索基本达成一种共识, 将 RNAi 技术应用于害虫防治的可行性方法可归纳为两种: 一是以昆虫取食为基础的植物转基因技术; 二是以浸泡为依据, 以研制 dsRNA 杀虫剂为目标的喷洒技术。这两种方法各有利弊。

通过构建 dsRNA 的转基因植株能够持续表达针对靶标基因的 dsRNA, 可以在一定程度上抑制靶标昆虫的取食。Mao 等 (2007) 将表达 *P450* 基因 (*CYP6AE14*) dsRNA 的拟南芥 *Arabidopsis thaliana* 和烟草 *Nicotiana tabacum* 饲喂棉铃虫 *Helicoverpa armigera*, 该基因的表达被显著降低, 而且棉铃虫对棉酚的耐受性大大减弱, 导致棉铃虫发育延迟; 同时, Baum 等 (2007) 的研究也表明, 玉米根萤叶甲 *Diabrotica virgifera virgifera* 在取食了表达 *V-ATPase* 基因 dsRNA 的转基因玉米后, 幼虫发育受阻或死亡。这两项研究被认为是 RNAi 技术在害虫防治领域中开创性的工作, 为 dsRNA 转基因植物替代 Bt 转基因植物提供了可能。但是, 由于植物体内存在能够剪切、降解 dsRNA 的 Dicer 酶及核酸酶等, 会在一定程度上影响 RNAi 效率。

2015 年的一项研究结果表明, 利用叶绿体表达昆虫的 dsRNA, 可以避免 dsRNA 被植物本身的 Dicer 剪切, 而且这些 dsRNA 可以直接被昆虫取食, 从而提高杀虫效果 (Zhang *et al.*, 2015)。该研究结果为利用植物介导的 RNAi 进行害虫防治提供了新的技术和方向。Khan 等 (2017) 用表达了扶桑绵粉蚧 *Phenacoccus solenopsis* *PsBur* 和 *PsV-ATPase* 基因 dsRNA 的烟草饲喂绵粉蚧, 结果发现, 取食两种转基因烟草的幼虫生长发育迟缓并且存活率都有所下降。Yoon 等 (2018b) 在烟草中表达二斑叶螨 *Tetranychus urticae* 不同基因的 dsRNA, 用叶盘饲喂的方法分析不同基因的 RNAi 效率。他们分别用表达保幼激素、蜕皮激素、甲基转移酶等基因 dsRNA

的烟草叶盘饲喂幼虫, 分别能引起 35% ~ 56% 的死亡率。这些研究充分说明, 利用植物表达昆虫 dsRNA 的方法可以用于害虫防治。值得注意的是, 国际上第一例玉米表达昆虫 dsRNA 的转基因玉米 MON87411 已经于 2017 年 6 月获得了美国环境署 (EPA) 的种植许可, 这将是一个具有里程碑意义的重要事件, 有可能开辟了将 RNAi 技术应用于害虫防治的新时代 (Zotti *et al.*, 2018)。

但是, 已有的研究结果表明, 适于植物转基因的昆虫靶标基因仅限于昆虫中肠的靶点。昆虫通过取食转基因植株, 摄取植物中表达的 dsRNA, 从而对其生长发育造成影响, 这些 dsRNA 需要经过中肠作用。非中肠表达的基因, 能否经受昆虫的消化过程进入特定组织中发挥作用还需要进一步证明。

喷洒的方法更为简便、快捷, 能够针对不同害虫、不同的发育时期设计特定的 dsRNA, 而且也能够同时以多个基因为靶标, 混合应用或者交替应用提高基因干扰和致死效率。但是, 这种方法也有很多需要解决的问题, 例如 dsRNA 的渗透效率、dsRNA 在环境中的存在时间等问题 (Joga *et al.*, 2016)。因此, 如何在数量庞大的昆虫基因组中选取有效的靶标基因, 这些靶标基因的 dsRNA 如何进入机体到达靶点并发挥最大效率, 不同靶标基因在害虫防治中的作用机理以及生物安全性等一系列问题都关系到该技术能否成功应用于害虫防治。

此外, Hunter 等 (2012) 提出了一种高度特异性的依赖植物自身传递 dsRNA 的害虫防治策略 (HiSPeC)。他们分别通过根浸泡以及树干注射的方式使柑橘和葡萄的树苗吸收 dsRNA, 处理 7 周后在树苗内仍能检测到 dsRNA。而且取食了植物的木虱和叶蝉体内也能检测到 dsRNA 的存在。他们的工作是第一次在实际农业生产上对 dsRNA 的递送方式和稳定性进行研究。Li 等 (2015) 通过根浸泡的方式在水稻和玉米植株内观察到了 dsRNA 吸收的现象, 将吸收 dsRNA 的植株分别饲喂飞虱和玉米螟, 都观察到了幼虫死亡率增高的现象。说明通过根吸收 dsRNA 的方式可以作为一种害虫防治的策略。Dalakouras 等 (2018) 发现在葡萄苗中可以通过树干注射以及叶柄吸收的方式将 dsRNA 输送到植物体内, 在树干处通过钻孔的方式将 siRNA 注射到植物体内, 1 d 后就能在顶端叶片里检测到 siRNA 的存在, 而通过叶柄吸收的方式, 处理 10 d 后顶端叶片部位能检测到 siRNA 的存在, 说明植物能够利用这种方式有效吸收 siRNA 并将其运送到其他

部位。

上述研究结果让我们看到了在大规模农业害虫防治中应用 RNAi 方法的可能性。我们可以考虑通过灌溉或喷洒的方式使植物吸收 dsRNA 并将其传递到全身各处来应对昆虫取食。尽管通过植物吸收和传递 dsRNA 目前已经被证明是确实可行的,但将其应用在农业生产上之前我们还有很多问题需要考虑。该方式需要大量的 dsRNA,直接通过体外合成 dsRNA 会使成本大大增加,我们需要找到一个能降低成本的 dsRNA 生产方式。Whitten 等(2016)在长红猎蝽 *Rhodnius prolixus* 的共生菌中表达针对靶标基因 *Nitrophorin* 的 dsRNA (dsNP),改造后的共生菌感染猎蝽后会与正常的共生菌竞争,在宿主体内引起系统性的靶标基因下调表型。他们已经用这种方式在两种不同种的昆虫上实现了 RNAi 效果,这样的方式对于非模式昆虫的 RNAi 具有重要的借鉴意义。通过酵母发酵生成大量 dsRNA 也可以作为一种 dsRNA 的传递系统进行 RNA 干扰(Murphy *et al.*, 2016)。这种利用微生物表达 dsRNA 的方法,可以作为生物制剂,直接喷洒在植物叶片上来防治害虫,为利用该技术进行害虫防治提供了一个新思路。

1.3 RNAi 在昆虫世代间传递及其潜在应用价值

用 dsRNA 处理昆虫后,能够在一定时间内检测到相应的 RNAi 效果。除此之外,研究人员还发现:在特定时期对昆虫发育的关键基因进行 RNAi 处理,可以将干扰效应传递到下一代,并产生类似系统性的影响,研究者将这种在 dsRNA 处理过的生物体后代中观察到的靶标基因沉默现象称为亲代 RNAi (parental RNAi, pRNAi)。

对赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* 雌虫注射 *Tc'* *Dll* 和 *mxp* 基因的 dsRNA 片段,发现能导致下一代胚胎中对应基因的沉默,并在幼虫发育过程中导致足的退化(Bucher *et al.*, 2002),这是首次发现亲代 RNAi 现象。目前在半翅目(Paim *et al.*, 2013; Coleman *et al.*, 2015)和鞘翅目昆虫(Shukla and Palli, 2014; Khajuria *et al.*, 2015; Fishilevich *et al.*, 2016a)中都观察到了 pRNAi 效应。

早在 2004 年,Liu 和 Kaufman 就利用 pRNAi 技术通过注射 dsRNA 进入雌成虫体内,研究 *Hunchback* 基因在乳草长椿 *Oncopeltus fasciatus* 生长发育过程中的作用,并得到相应的结果(Liu and Kaufman, 2004)。大多数情况下,pRNAi 的应用是通过注射的方式进行的,但是,Coleman 等(2015)在桃蚜 *Myzus persicae* 中通过口服和植物转基因技术

也观察到了 pRNAi 现象。他们利用植物介导的 RNAi 技术研究蚜虫的基因功能,用表达 dsRNA 的转基因拟南芥饲喂蚜虫,发现将蚜虫从转基因拟南芥上移除之后,dsRNA 对蚜虫基因的干扰效果能够维持 6 d 之久。在取食转基因拟南芥的蚜虫产生的后代中,目标基因表达量下调的表型能够持续 12 d,同时,后代蚜虫的繁殖率也下降了 40% ~ 60%。他们的研究表明,RNAi 效应是有可能传递到下一代昆虫体内,并能发挥一定的害虫控制作用。

在鞘翅目昆虫玉米根萤叶甲中,pRNAi 反应也已经得到证明。玉米根萤叶甲中有两个基因 *Hunchback* (*hb*) 和 *brahma* (*brm*) 与胚胎发育有关,Khajuria 等(2015)分别合成了 *brm* 和 *hb* 的 dsRNA,将 dsRNA 饲喂给玉米根萤叶甲雌性成虫,dsRNA 饲喂导致成虫 *hb* 和 *brm* 转录水平明显降低。虽然产卵量没有受到明显的影响,但取食 dsRNA 后的成虫所产的卵几乎全部没有孵化。这些结果证实了 RNAi 在玉米根萤叶甲中具有系统性,能够以跨代的方式将 dsRNA 传递到下一代。基于这些结果,pRNAi 被认为是一种潜在的根虫防治方法。随后,Fishilevich 等(2016b)对玉米根萤叶甲中影响 pRNAi 效应的因素进行了研究,发现 dsRNA 的浓度及饲喂持续时间都会影响 pRNAi 效率。他们的结果为 pRNAi 技术在害虫防治和耐药性治理方面的应用提供了一个有效的策略:可以利用同时表达 dsRNA 和 Bt 蛋白的转基因植物来降低昆虫产生抗性的风险。然而,目前尚不清楚植物表达的 dsRNA 是否可以通过 pRNAi 的方式对下一代幼虫进行有效控制。

RNAi 在不同物种昆虫中的世代传递现象,对 RNAi 在害虫防治中的研究和应用具有重要的借鉴意义,也进一步证明了 RNAi 技术在害虫防治中应用的可行性。

2 RNAi 应用于害虫防治需要注意的关键问题

RNAi 具有很好的种属和序列特异性,能够实现对某种害虫的种类专一性防治,通过 RNAi 的方式对害虫进行防治目前已经取得了很大的进展(Joga *et al.*, 2016; Guan *et al.*, 2017; Mamta and Rajam, 2017)。但是,近 20 来年的研究表明,RNA 干扰的效率很容易受到多种因素的影响,是目前最受关注的问题。下面着重介绍一下靶标基因选择、昆

虫中肠核酸酶以及不同昆虫 dsRNA 剪切方式对 RNAi 效率的影响。

2.1 靶标基因选择对 RNAi 效率的影响

在诸多影响 RNAi 效率的因素中,靶标基因筛选起着至关重要的作用,这方面目前已经有很多人进行了研究。Whyard 等(2009)的研究表明,用每种昆虫特异的 *V-ATPase* 基因的 dsRNA 分别饲喂黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster*、赤拟谷盗、豌豆蚜 *Acyrtosiphon pisum* 和烟草天蛾 *Manduca sexta* 并不能导致这几种昆虫普遍死亡。Terenius 等(2011)对鳞翅目昆虫中 RNAi 应用情况进行了综述。通过对大量已发表和未发表的实验数据进行分析,他们发现在多种鳞翅目昆虫中,天蚕蛾科昆虫的 RNAi 效率相对较高;相比于表皮表达的基因来讲,昆虫免疫相关基因具有更好的 RNA 干扰效果。他们分析了 130 个基因的 RNAi 效果,发现只有 38% 的基因对靶标基因具有较好的沉默效果,48% 的基因几乎没有沉默效果或效果很微弱。上述研究结果说明不同昆虫的不同基因其 RNAi 效率存在非常显著的差异,这也给我们筛选有效的 RNAi 靶标基因增加了难度。

我们在研究过程中还发现,有些基因不仅不能被其 dsRNA 抑制,在短时间内甚至还会被 dsRNA 诱导上调表达,尤其是一些免疫相关基因。因此,我们猜想一些参与昆虫免疫或应激反应的基因,当外源的 dsRNA 进入其体内后,因应激反应被诱导的上调表达会抵消其基因干扰效果 (Guan *et al.*, 2018c)。这一发现从一个侧面说明基因本身对 RNAi 的效率有很大影响。

2.2 昆虫种类对 RNAi 效率的影响

昆虫种类也是影响 RNAi 效率的一个关键因素,一些研究结果显示,鞘翅目昆虫的 RNAi 效率比较高,而针对蛾类和蝶类等鳞翅目昆虫的 RNAi 效果都不太理想 (Zhu *et al.*, 2011; Scott *et al.*, 2013; Palli, 2014)。研究人员对鞘翅目和鳞翅目昆虫间的 RNAi 效率差异进行了很多研究,目前认为影响鳞翅目昆虫 RNAi 效率的可能原因有以下几种: dsRNA 被细胞吸收的效率较低, dsRNA 被降解, RNAi 关键蛋白表达量低,以及存在特殊的 RNAi 通路相关基因等等。

Kobayashi 等(2012)发现鳞翅目昆虫的细胞对 dsRNA 的吸收效率低于鞘翅目昆虫。昆虫吸收 dsRNA 主要通过两种途径: Sid-1 蛋白通路和吞噬途径。多数种类的昆虫只含有一个 *Sid-1* 类似基因,

而在几种鞘翅目昆虫基因组中却存在 2 个甚至 3 个 *Sid-1* 类似基因 (Miyata *et al.*, 2014; Cappelle *et al.*, 2016)。*Sid-1* 蛋白的存在可能是导致鞘翅目昆虫对 dsRNA 吸收效率高的原因。Shukla 等(2016)发现鳞翅目昆虫细胞能够对 dsRNA 进行有效的吸收,但提取细胞总 RNA 后却检测不到相应的 siRNA 片段;他们又进一步通过实验发现, dsRNA 在鳞翅目昆虫体内被降解的速率显著高于鞘翅目昆虫。

已有的研究表明,大部分的 dsRNA 进入昆虫体内后会首先被血淋巴或者中肠中存在的核酸酶降解,使其不能进入 RNAi 途径发挥沉默靶标基因的功能。这类核酸酶的存在被认为是影响 RNAi 效率的关键 (Wang *et al.*, 2016)。

线虫中编码 3' - 5' 核酸外切酶的基因 *Eri-1* 突变后,线虫对 RNAi 的敏感性增强 (Kennedy *et al.*, 2004)。Spit 等(2017)在马铃薯甲虫 *Leptinotarsa decemlineata* 中发现了两个只在中肠特异表达的核酸酶基因,核酸酶功能缺失的马铃薯甲虫对 dsRNA 更为敏感。Song 等(2018)鉴定到两个在东亚飞蝗 *Locusta migratoria* 血淋巴中高表达的 dsRNA 核酸酶基因 *LmdsRNase 1* 和 *LmdsRNase 4*, 体外表达的 *LmdsRNase 1* 能够在 pH 5 的环境下高效降解 dsRNA。本实验室在对亚洲玉米螟 *Ostrinia furnaculis* 的研究中发现了一个仅在几种鳞翅目昆虫特异表达的核酸酶基因 *REase*, 当 dsRNA 进入玉米螟体内后该酶被大量诱导,抑制该基因的表达,玉米螟体内能够富集更多的 small RNA,进而产生更高效的 RNAi 效应 (Guan *et al.*, 2018b)。我们推测这可能是导致某些鳞翅目昆虫 RNAi 效率较低的一个重要原因。因此,提前或同时抑制这些核酸降解酶的表达,可能是提高鳞翅目昆虫 RNAi 效率的一种方法。

除此之外,在鞘翅目昆虫中也发现了一类特异的蛋白 *StaufenC*, 其同源基因只在鞘翅目昆虫中存在。对 dsRNA 不敏感的马铃薯甲虫细胞中, *StaufenC* 基因表达量较低,同时,抑制该基因在细胞中的表达量也会导致马铃薯甲虫细胞系对 RNAi 产生抗性。在马铃薯甲虫幼虫中先注射 ds*StaufenC* 降低该基因的表达量, ds*GFP* 在幼虫体内不能被剪切产生 siRNA。该研究结果证明鞘翅目昆虫特异的 *StaufenC* 基因参与了 dsRNA 的剪切过程,这可能是鞘翅目昆虫相较于鳞翅目昆虫 RNAi 效率更高的原因之一 (Yoon *et al.*, 2018a)。

综上所述,影响昆虫 RNAi 效率的因素不是单

一的,对不同的因素进行分析可以指导我们设计合理的实验方案,实现更好的 RNAi 效果。

2.3 dsRNA 在不同昆虫中的剪切方式

dsRNA 进入细胞后,首先被 Dicer 剪切成 siRNA,siRNA 识别特异的基因位点,结合并阻遏基因的转录表达,最终实现对靶标基因的沉默作用 (Starega-Roslan *et al.*, 2015),因此,dsRNA 被有效识别并剪切是影响 RNAi 效率的关键因素。但是我们对于 Dicer 是如何识别 dsRNA 并剪切产生特定长度的 siRNA 这一过程的分子机制并不清楚。

Dicer 是一个高度保守的 ATP 依赖的核酸内切酶,属于 RNase III 家族。典型的 Dicer 蛋白一般包含几个保守的结构域:一个 N 末端螺旋结构,DUF283,PAZ 结构,两个 RNase III 结构域和一个双链 RNA 结合结构域(dsRNA binding domain, dsRBD) (Hoehener *et al.*, 2018; Sinha *et al.*, 2018; Zhu *et al.*, 2018)。也有很多 Dicer 蛋白缺少某些结构域,比如鞭毛虫的 Dicer 酶就只包含 PAZ 和 RNase III 结构域 (MacRae *et al.*, 2006)。

目前已经发现 PAZ 和 dsRBD 结构域是 Dicer 蛋白识别和结合 dsRNA 底物的功能区域 (Anand and Sanjeev, 2016; Alagia *et al.*, 2018; Suarez *et al.*, 2018),Dicer 的两个 RNase III 结构域以分子内二聚体的形式形成一个剪切 dsRNA 的活性位点 (Zhang *et al.*, 2004; Aguado and tenOever, 2018)。许多已知的核糖核酸内切酶会根据剪切位点附近的一个或几个特定的核苷酸碱基选择它们的剪切底物。

2015 年,研究人员在枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* 中找到了能够对 dsRNA 进行序列特异性剪切的核糖核酸酶 Mini III (BsMini III)。BsMini III 以二聚体的形式发挥活性,但剪切产物并不是完全对称的结构,BsMini III 二聚体更倾向于在 ACCU/AGGU 的位置对 dsRNA 进行剪切 (Glow *et al.*, 2015)。Glow 等 (2016) 对 8 个不同细菌来源的 Mini-III 家族的核糖核酸酶的剪切序列特异性进行了分析。他们发现,这些核糖核酸酶与底物的结合力的强弱对其剪切作用的影响不大,不同的选择性剪切主要是由剪切步骤所决定的。最近的一项研究结果表明,在草履虫 *Paramecium* 中,通过体外测试证明 3 个 Dicer-like 酶均具有明显的序列偏好性 (Hoehener *et al.*, 2018)。

本研究团队利用小 RNA 测序技术,将同样序列的 dsGFP 注射到两类昆虫体内,经小 RNA 测序及其剪切位点的分析,发现鳞翅目昆虫在 dsRNA 加工

过程中的剪切偏好性位点是 GGU;作为鞘翅目昆虫的代表,在赤拟谷盗中没有发现同样的规律,相反,其对 dsRNA 的剪切偏好性位点更加多变 (Guan *et al.*, 2018a)。在鞘翅目昆虫中,dsRNA 具有较多的剪切偏好性位点,这可能是导致鞘翅目昆虫 RNAi 效率明显高于鳞翅目昆虫的原因之一,也可能是导致不同物种昆虫 RNAi 效率多样性的原因之一。

3 提高 RNAi 效率的有效方法

筛选到合适的靶标基因,并且能够产生高效的 RNAi 效应,是 RNAi 技术能否应用于害虫防治的关键。但是,不管以何种方式使 dsRNA 进入昆虫体内,在其被细胞有效吸收之前,dsRNA 一直处于昆虫的血淋巴或肠腔液中,很容易被各种酶消化降解,尤其是对于 RNAi 效率较低的鳞翅目昆虫来说更是如此 (Garbutt *et al.*, 2013; Lim *et al.*, 2016; Mamta *et al.*, 2017; Peng *et al.*, 2018)。因此,提高 dsRNA 进入昆虫体内之后的稳定性,可能有助于提高对 dsRNA 不敏感昆虫的 RNAi 效率。目前这方面的研究主要集中在以脂质体或纳米粒子对 dsRNA 进行包裹以保护其不被消化系统内的各种酶降解 (Joga *et al.*, 2016)。

3.1 脂质体修饰

化学合成的脂质体是目前应用比较广泛的 dsRNA 递送系统。对德国小蠊 *Blattella germanica* 注射 dsRNA 很容易产生 RNAi 效应,但是饲喂 dsRNA 却不容易实现 RNAi 效果。Lin 等 (2016) 发现用脂质体包被 dsRNA 能够促进细胞对 dsRNA 的吸收,并且靶标基因 α -tubulin 的下调能够引起德国小蠊 100% 的死亡率。Huang 等 (2018) 用脂质体包被 dsRNA 的方法,发现只需要少量 dsRNA 就能在德国小蠊体内实现对靶标基因的沉默效果。Taning 等 (2016) 在斑翅果蝇 *Drosophila suzukii* 中利用脂质体实现了靶标基因沉默的效果。他们分别合成了 3 个基因的 dsRNA,直接将 dsRNA 添加在饲料里饲喂,均不能在斑翅果蝇体内检测到靶标基因的沉默,当把 dsRNA 与脂质体一起添加到饲料里饲喂的情况下,能检测到明显的靶标基因沉默,同时果蝇出现了致死的表型。这说明通过脂质体修饰后的 dsRNA 具有较高的稳定性,能够减缓 dsRNA 被核酸酶降解的过程。除此之外,由于脂质体与细胞磷脂结构的生物相容性,以脂质体对 dsRNA 进行包被能

够提高细胞对 dsRNA 的吸收效率,因此,用脂质体作为载体来递送 dsRNA 是一种有效提高昆虫 RNAi 效率的可行方案(Wu *et al.*, 2009)。

3.2 纳米粒子包被

纳米粒子是一种便于进行表面修饰且对环境安全的多聚体颗粒,以纳米粒子携带 dsRNA 分子进入昆虫体内,可以显著地提高昆虫取食 dsRNA 后的基因沉默效果。在昆虫中首次发现纳米粒子能够提高 RNAi 效率的实验是在冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae* 中进行的。Zhang 等(2010)用壳聚糖多聚体粒子包裹的 dsRNA 饲喂冈比亚按蚊,发现能够有效地沉默靶标基因的表达。He 等(2014)发现了一种能够作为基因载体携带 dsRNA 进入细胞的荧光纳米粒子,该纳米粒子对细胞无毒性,并且具有较高的转染效率。他们将携带发光基团的纳米粒子和 *CHT10* dsRNA 溶液添加在饲料里饲喂玉米螟,实验组玉米螟 *CHT10* 基因的表达量显著降低,而且幼虫出现了生长和蜕皮障碍以及致死的现象。他们的研究是首次在昆虫体内针对发育相关的关键基因,以纳米粒子作为载体取得较好的 RNAi 效果。Christiaens 等(2018)开发了一种包含胍基基团的纳米粒子,该多聚体粒子能够保护 dsRNA 分子在碱性环境中不被降解,被纳米粒子包被的 dsRNA 分子能够在 pH 11 的环境中存在 30 h,而且被细胞吸收的效率也有明显增强。他们针对甜菜夜蛾几丁质合成酶 B 基因合成 dsRNA,经过饲喂实验,发现被纳米粒子包被的 dsRNA 具有更好的 RNAi 效率,对幼虫的致死率提高到 53%。他们的结果证明了纳米粒子可以作为一种新的运输方式,提高 dsRNA 在鳞翅目昆虫体内的稳定性,为 RNAi 在害虫防治领域的应用提供了一种新的策略。

4 小结与展望

RNAi 具有高效、特异性强等优点,因此被广泛应用于昆虫基因功能及害虫防治研究。RNAi 的应用方式多样,目前通过注射、饲喂和浸泡等方法在很多种昆虫中都取得了基因下调和昆虫致死的效果,为该技术应用于害虫防治提供了理论依据。当然,目前 RNAi 技术在害虫防治中的应用也存在着一些问题,不同靶标基因以及不同昆虫之间 RNAi 效率差异很大,尤其值得关注的是作为重要农业害虫的鳞翅目昆虫,多数种类对 RNAi 不敏感。造成这种现象的原因有多种,已有的研究表明,dsRNA 进入

昆虫中肠或血淋巴中被降解是首要的原因(Song *et al.*, 2017; Guan *et al.*, 2018b)。其次,Dicer 对 dsRNA 进行剪切是整个 RNAi 过程的关键步骤,而 dsRNA 在不同物种昆虫中的剪切形式也是导致 RNAi 效率不同的原因之一。目前,一些新的 dsRNA 修饰方式,如脂质体修饰、纳米粒子包埋等可以缓解 dsRNA 的降解效率,进而提高 RNAi 效率,从而促进昆虫 RNAi 技术的研究及其在害虫防治中的应用。

参考文献 (References)

- Aguado LC, tenOever BR, 2018. RNase III nucleases and the evolution of antiviral systems. *BioEssays*, 40(2): 1700173.
- Alagia A, Jorge AF, Avino A, Cova TFGG, Crehuet R, Grijalvo S, Pais AACC, Eritja R, 2018. Exploring PAZ/3'-overhang interaction to improve siRNA specificity. A combined experimental and modeling study. *Chem. Sci.*, 9(8): 2074–2086.
- Anand R, Sanjeev BS, 2016. Insights into the structural integrity and dynamics of siRNA-PAZ complex. *J. Biomol. Struct. Dyn.*, 35(14): 2987–2996.
- Bartel DP, 2004. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 116(2): 281–297.
- Baum JA, Bogaert T, Clinton W, Heck GR, Feldmann P, Ilagan O, Johnson S, Plaetinck G, Munyikwa T, Pleau M, Vaughn T, Roberts J, 2007. Control of coleopteran insect pests through RNA interference. *Nat. Biotechnol.*, 25(11): 1322–1326.
- Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ, 2001. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*, 409(6818): 363–366.
- Bettencourt R, Terenius O, Faye I, 2002. Hemolin gene silencing by ds-RNA injected into *Cecropia* pupae is lethal to next generation embryos. *Insect Mol. Biol.*, 11(3): 267–271.
- Bucher G, Scholten J, Klingler M, 2002. Parental RNAi in *Tribolium* (Coleoptera). *Curr. Biol.*, 12(3): R85–R86.
- Cappelle K, de Oliveira CFR, Van Eynde B, Christiaens O, Smagghe G, 2016. The involvement of clathrin-mediated endocytosis and two Sid-1-like transmembrane proteins in double-stranded RNA uptake in the Colorado potato beetle midgut. *Insect Mol. Biol.*, 25(3): 315–323.
- Christiaens O, Smagghe G, 2014. The challenge of RNAi-mediated control of hemipterans. *Curr. Opin. Insect Sci.*, 6: 15–21.
- Christiaens O, Tardajos MG, Martinez Reyna ZL, Dash M, Dubrue P, Smagghe G, 2018. Increased RNAi efficacy in *Spodoptera exigua* via the formulation of dsRNA with guanlylated polymers. *Front. Physiol.*, 9: 316.
- Coleman AD, Wouters RHM, Mugford ST, Hogenhout SA, 2015. Persistence and transgenerational effect of plant-mediated RNAi in aphids. *J. Exp. Bot.*, 66(2): 541–548.
- Cui SQ, Hou G, Huang DN, 2017. Study on siRNA-induced silencing complex (RISC). *Genomics Appl. Biol.*, 36(7): 2799–2803. [崔

- 世权, 侯敢, 黄迪南, 2017. siRNA 诱导基因沉默复合物 (RISC) 的研究. 基因组学与应用生物学, 36(7): 2799–2803]
- Dalakouras A, Jarausch W, Buchholz G, Bassler A, Braun M, Manthey T, Krczal G, Wassenegger M, 2018. Delivery of hairpin RNAs and small RNAs into woody and herbaceous plants by trunk injection and petiole absorption. *Front. Plant Sci.*, 9: 1253.
- Deng P, Xu QY, Fu KY, Guo WC, Li GQ, 2018. RNA interference against the putative insulin receptor substrate gene *chico* affects metamorphosis in *Leptinotarsa decemlineata*. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 103: 1–11.
- Ellango R, Asokan R, Chandra GS, Kumar NKK, Mahmood R, Ramamurthy VV, 2018. Tyrosine hydroxylase, a potential target for the RNAi-mediated management of diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). *Fla. Entomol.*, 101(1): 1–5.
- Feng XY, Zhang SZ, 2017. Research advances on RNAi mechanism and its application. *Biotech. Bull.*, 33(5): 1–8. [冯小艳, 张树珍, 2017. RNAi 作用机制及应用研究进展. 生物技术通报, 33(5): 1–8]
- Fire A, Xu SQ, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC, 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391(6669): 806–811.
- Fishilevich E, Velez AM, Khajuria C, Frey MLF, Hamm RL, Wang HC, Schulenberg GA, Bowling AJ, Pence HE, Gandra P, Arora K, Storer NP, Narva KE, Siegfried BD, 2016a. Use of chromatin remodeling ATPases as RNAi targets for parental control of western corn rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera*) and Neotropical brown stink bug (*Euschistus heros*). *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 71: 58–71.
- Fishilevich E, Velez AM, Storer NP, Li HR, Bowling AJ, Rangasamy M, Worden SE, Narva KE, Siegfried BD, 2016b. RNAi as a management tool for the western corn rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera*. *Pest Manag. Sci.*, 72(9): 1652–1663.
- Garbutt JS, Belles X, Richards EH, Reynolds SE, 2013. Persistence of double-stranded RNA in insect hemolymph as a potential determiner of RNA interference success: evidence from *Manduca sexta* and *Blattella germanica*. *J. Insect Physiol.*, 59(2): 171–178.
- Glow D, Kurkowska M, Czarnecka J, Szczepaniak K, Pianka D, Kappert V, Bujnicki JM, Skowronek KJ, 2016. Identification of protein structural elements responsible for the diversity of sequence preferences among Mini-III RNases. *Sci. Rep.*, 6: 38612.
- Glow D, Pianka D, Sulej AA, Kozłowski ŁP, Czarnecka J, Chojnowski G, Skowronek KJ, Bujnicki JM, 2015. Sequence-specific cleavage of dsRNA by Mini-III RNase. *Nucleic Acids Res.*, 43(5): 2864–2873.
- Guan RB, Hu SR, Li HC, Shi ZY, Miao XX, 2018a. The *in vivo* dsRNA cleavage has sequene preference in insects. *Front. Physiol.*, 9: 1768.
- Guan RB, Li HC, Fan YJ, Hu SR, Christiaens O, Smaghe G, Miao XX, 2018b. A nuclease specific to lepidopteran insects suppresses RNAi. *J. Biol. Chem.*, 293(16): 6011–6021.
- 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*. *J. Pest Sci.*, 90(2): 745–757.
- Guan RB, Li HC, Miao XX, 2018c. Prediction of effective RNA interference targets and pathway-related genes in lepidopteran insects by RNA sequencing analysis. *Insect Sci.*, 25(3): 356–367.
- He BC, Chu Y, Yin MZ, Müllen K, An CJ, Shen J, 2014. Fluorescent nanoparticle delivered dsRNA toward genetic control of insect pests. *Adv. Mater.*, 25(33): 4580–4584.
- Hoehener C, Hug I, Nowacki M, 2018. Dicer-like enzymes with sequence cleavage preferences. *Cell*, 173(1): 234–247.
- Huang JH, Liu Y, Lin YH, Belles X, Lee HJ, 2018. Practical use of RNA interference; oral delivery of double-stranded RNA in liposome carriers for cockroaches. *J. Vis. Exp.*, (135): e57385.
- Hunter WB, Glick E, Paldi N, Bextine BR, 2012. Advances in RNA interference; dsRNA treatment in trees and grapevines for insect pest suppression. *Southwest. Entomol.*, 37: 85–87.
- Huvenne H, Smaghe G, 2010. Mechanisms of dsRNA uptake in insects and potential of RNAi for pest control: a review. *J. Insect Physiol.*, 56(3): 227–235.
- Jiang YD, Yuan X, Bai YL, Wang GY, Zhou WW, Zhu ZR, 2018. Knockdown of timeless disrupts the circadian behavioral rhythms in *Laodelphax striatellus* (Hemiptera: Delphacidae). *Environ. Entomol.*, 47(5): 1216–1225.
- Joga MR, Zotti MJ, Smaghe G, Christiaens O, 2016. RNAi efficiency, systemic properties, and novel delivery methods for pest insect control: what we know so far. *Front. Physiol.*, 7: 553.
- Kennedy S, Wang D, Ruvkun G, 2004. A conserved siRNA-degrading RNase negatively regulates RNA interference in *C. elegans*. *Nature*, 427(6975): 645–649.
- Khajuria C, Velez AM, Rangasamy M, Wang HC, Fishilevich E, Frey MLF, Carneiro NP, Gandra P, Narva KE, Siegfried BD, 2015. Parental RNA interference of genes involved in embryonic development of the western corn rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 63: 54–62.
- Khan AM, Ashfaq M, Khan AA, Naseem MT, Mansoor S, 2017. Evaluation of potential RNA-interference-target genes to control cotton mealybug, *Phenacoccus solenopsis* (Hemiptera: Pseudococcidae). *Insect Sci.*, 25(5): 778–786.
- Kobayashi I, Tsukioka H, Komoto N, Uchino K, Sezutsu H, Tamura T, Kusakabe T, Tomita S, 2012. SID-1 protein of *Caenorhabditis elegans* mediates uptake of dsRNA into *Bombyx* cells. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 42(2): 148–154.
- Li HC, Guan RB, Guo HM, Miao XX, 2015. New insights into an RNAi approach for plant defence against piercing-sucking and stem-borer insect pests. *Plant Cell Environ.*, 38(11): 2277–2285.
- Lim ZX, Robinson KE, Jain RG, Sharath Chandra G, Asokan R, Asgari S, Mitter N, 2016. Diet-delivered RNAi in *Helicoverpa armigera* – progresses and challenges. *J. Insect Physiol.*, 85: 86–93.
- Lin YH, Huang JH, Liu Y, Belles X, Lee HJ, 2016. Oral delivery of dsRNA lipoplexes to German cockroach protects dsRNA from degradation and induces RNAi response. *Pest Manag. Sci.*, 73(5): 960–966.
- Liu PZ, Kaufman TC, 2004. *hunchback* is required for suppression of

- abdominal identity, and for proper germband growth and segmentation in the intermediate germband insect *Oncopeltus fasciatus*. *Development*, 131(7): 1515–1527.
- MacRae IJ, Zhou KH, Li F, Repic A, Brooks AN, Cande WZ, Adams PD, Doudna JA, 2006. Structural basis for double-stranded RNA processing by dicer. *Science*, 311(5758): 195–198.
- Mamta B, Rajam MV, 2017. RNAi technology: a new platform for crop pest control. *Physiol. Mol. Biol. Plants*, 23(3): 487–501.
- Mao YB, Cai WJ, Wang JW, Hong GJ, Tao XY, Wang LJ, Huang YP, Chen XY, 2007. Silencing a cotton bollworm P450 monooxygenase gene by plant-mediated RNAi impairs larval tolerance of gossypol. *Nat. Biotechnol.*, 25(11): 1307–1313.
- Miyata K, Ramaseshadri P, Zhang Y, Segers G, Bolognesi R, Tomoyasu Y, 2014. Establishing an *in vivo* assay system to identify components involved in environmental RNA interference in the western corn rootworm. *PLoS ONE*, 9(7): e101661.
- Murphy KA, Tabuloc CA, Cervantes KR, Chiu JC, 2016. Ingestion of genetically modified yeast symbiont reduces fitness of an insect pest via RNA interference. *Sci. Rep.*, 6(1): 22587.
- Niu J, Shen G, Christiaens O, Smagghe G, He L, Wang J, 2018. Beyond insects: current status, achievements and future perspectives of RNAi in mite pests. *Pest Manag. Sci.*, 74(12): 2680–2687.
- Paim RM, Araujo RN, Lehane MJ, Gontijo NF, Pereira MH, 2013. Long-term effects and parental RNAi in the blood feeder *Rhodnius prolixus* (Hemiptera; Reduviidae). *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 43(11): 1015–1020.
- Palli SR, 2014. RNA interference in Colorado potato beetle: steps toward development of dsRNA as a commercial insecticide. *Curr. Opinion Insect Sci.*, 6: 1–8.
- Peng YC, Wang KX, Fu WX, Sheng CW, Han ZJ, 2018. Biochemical comparison of dsRNA degrading nucleases in four different insects. *Front. Physiol.*, 9: 624.
- Santos-Ortega Y, Killiny N, 2018. Silencing of sucrose hydrolase causes nymph mortality and disturbs adult osmotic homeostasis in *Diaphorina citri* (Hemiptera; Liviidae). *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 101: 131–143.
- Scott JG, Michel K, Bartholomay LC, Siegfried BD, Hunter WB, Smagghe G, Zhu KY, Douglas AE, 2013. Towards the elements of successful insect RNAi. *J. Insect Physiol.*, 59(12): 1212–1221.
- Shukla JN, Kalsi M, Sethi A, Narva KE, Fishilevich E, Singh S, Mogilicherla K, Palli SR, 2016. Reduced stability and intracellular transport of dsRNA contribute to poor RNAi response in lepidopteran insects. *RNA Biol.*, 13(7): 656–669.
- Shukla JN, Palli SR, 2014. Production of all female progeny: evidence for the presence of the male sex determination factor on the Y chromosome. *J. Exp. Biol.*, 217(10): 1653–1655.
- Sinha NK, Iwasa J, Shen PS, Bass BL, 2018. Dicer uses distinct modules for recognizing dsRNA termini. *Science*, 359(6373): 329–334.
- Song HF, Zhang JQ, Li DQ, Cooper AMW, Silver K, Li T, Liu XJ, Ma EB, Zhu KY, Zhang JZ, 2017. A double-strand RNA degrading enzyme reduces the efficiency of oral RNA interference in migratory locust. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 86: 68–80.
- Song HF, Fan YH, Zhang JQ, Cooper AMW, Silver K, Li DQ, Li T, Ma EB, Zhu KY, Zhang JZ, 2018. Contributions of dsRNases to differential RNAi efficiencies between the injection and oral delivery of dsRNA in *Locusta migratoria*. *Pest Manag. Sci.*, doi:10.1002/ps.5291.
- Spit J, Philips A, Wynant N, Santos D, Plaetinck G, Broeck JV, 2017. 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*. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 81: 103–116.
- Starega-Roslan J, Galka-Marciniak P, Krzyzosiak WJ, 2015. Nucleotide sequence of miRNA precursor contributes to cleavage site selection by Dicer. *Nucleic Acids Res.*, 43(22): 10939–10951.
- Suarez IP, Gauto DF, Hails G, Mascali FC, Crespo R, Zhao LZ, Wang J, Rasia RM, 2018. Conformational sampling of the intrinsically disordered dsRBD-1 domain from *Arabidopsis thaliana* DCL1. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 20(16): 11237–11246.
- Taning CNT, Christiaens O, Berkvens N, Casteels H, Maes M, Smagghe G, 2016. Oral RNAi to control *Drosophila suzukii*: laboratory testing against larval and adult stages. *J. Pest Sci.*, 89(3): 803–814.
- Terenius O, Papanicolaou A, Garbutt JS, Eleftherianos I, Huvenne H, Kanginakudru S, Albrechtsen M, An CJ, Aymeric JL, Barthel A, Bebas P, Bitra K, Bravo A, Chevalier F, Collinge DP, Crava CM, de Maagd RA, Duvic B, Erlandson M, Faye I, Felfoldi G, Fujiwara H, Futahashi R, Gandhe AS, Gatehouse HS, Gatehouse LN, Giebertowicz JM, Gómez I, Grimmelikhuijzen CJP, Groot AT, Hauser F, Heckel DG, Hegedus DD, Hrycaj S, Huang LH, Hull JJ, Iatrou K, Iga M, Kanost MR, Kotwica J, Li CY, Li JH, Liu JS, Lundmark M, Matsumoto S, Meyering-Vos M, Millichap PJ, Monteiro A, Mrinal N, Niimi T, Nowara D, Ohnishi A, Oostra V, Ozaki K, Papakonstantinou M, Popadic A, Rajam MV, Saenko S, Simpson RM, Soberón M, Strand MR, Tomita S, Toprak U, Wang P, Wee CW, Whyard S, Zhang WQ, Nagaraju J, French-Constant RH, Herrero S, Gordon K, Swevers L, Smagghe G, 2011. RNA interference in Lepidoptera: an overview of successful and unsuccessful studies and implications for experimental design. *J. Insect Physiol.*, 57(2): 231–245.
- Tijsterman M, Plasterk RHA, 2004. Dicers at RISC: the mechanism of RNAi. *Cell*, 117(1): 1–3.
- Wang KX, Peng YC, Pu J, Fu WX, Wang JL, Han ZJ, 2016. Variation in RNAi efficacy among insect species is attributable to dsRNA degradation in vivo. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 77: 1–9.
- Whitten MMA, Facey PD, Del Sol R, Fernández-Martínez LT, Evans MC, Mitchell JJ, Bodger OG, Dyson PJ, 2016. Symbiont-mediated RNA interference in insects. *Proc. R. Soc. B*, 283: 20160042.
- Whyard S, Singh AD, Wong S, 2009. Ingested double-stranded RNAs can act as species-specific insecticides. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 39(11): 824–832.
- Wu SY, McMillan NAJ, 2009. Lipidic systems for *in vivo* siRNA delivery. *AAPS J.*, 11(4): 639–652.
- Yoon JS, Mogilicherla K, Gurusamy D, Chen X, Cherreddy SCRR,

Palli SR, 2018a. Double-stranded RNA binding protein, Staufen, is required for the initiation of RNAi in coleopteran insects. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 115(33): 8334 – 8339.

Yoon JS, Sahoo DK, Maiti IB, Palli SR, 2018b. Identification of target genes for RNAi-mediated control of the twospotted spider mite. *Sci. Rep.*, 8: 14687.

Zhang H, Li HC, Miao XX, 2013. Feasibility, limitation and possible solutions of RNAi-based technology for insect pest control. *Insect Sci.*, 20(1): 15 – 30.

Zhang HD, Kolb FA, Jaskiewicz L, Westhof E, Filipowicz W, 2004. Single processing center models for human dicer and bacterial RNase III. *Cell*, 118(1): 57 – 68.

Zhang J, Khan SA, Hasse C, Ruf S, Heckel DR, Bock R, 2015. Full crop protection from an insect pest by expression of long double-stranded RNAs in plastids. *Science*, 347(6225): 991 – 994.

Zhang J, Khan SA, Heckel DG, Bock R, 2017. Next-generation insect-resistant plants: RNAi-mediated crop protection. *Trends Biotech.*, 35(9): 871 – 882.

Zhang X, Zhang J, Zhu KY, 2010. Chitosan/double-stranded RNA nanoparticle-mediated RNA interference to silence chitin synthase genes through larval feeding in the African malaria mosquito (*Anopheles gambiae*). *Insect Mol. Biol.*, 19(5): 683 – 693.

Zhu F, Xu JJ, Palli R, Ferguson J, Palli SR, 2011. Ingested RNA interference for managing the populations of the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*. *Pest Manag. Sci.*, 67(2): 175 – 182.

Zhu L, Kandasamy SK, Fukunaga R, 2018. Dicer partner protein tunes the length of miRNAs using base-mismatch in the pre-miRNA stem. *Nucleic Acids Res.*, 46(7): 3726 – 3741.

Zotti M, Dos Santos EA, Cagliari D, Christiaens O, Taning CNT, Smagghe G, 2018. RNA interference technology in crop protection against arthropod pests, pathogens and nematodes. *Pest Manag. Sci.*, 74(6): 1239 – 1250.

(责任编辑: 赵利辉)