豌豆蚜防控的关键RNAi靶标基因筛选与分析

宗诗轩[1] 李 涛[1] 黄 清[1] 程保平[2*] 赵弘巍[1*]

（1. 南京农业大学植物保护学院，南京 210095；2. 广东省农业科学院植物保护研究所，广东省植物保护新技术重点实验室，农业农村部华南果蔬绿色防控重点实验室，广州 510640）

摘要：为筛选防控豌豆蚜 *Acyrthosiphon pisum* 的关键RNA干扰（RNA interference，RNAi）靶标基因，通过构建精氨酸激酶（arginine kinase，AK）、超氧化物歧化酶（superoxide dismutase，SOD）和几丁质合成酶（chitin synthase，CHS）这3个与豌豆蚜生长发育相关基因的dsRNA，于室内检测ds*AK*、ds*SOD*和ds*CHS*处理后对其致死效果，并比较4种dsRNA递送方式对其致死效果的影响，筛选获得防治效果明显的dsRNA及其递送方式。结果显示，处理48~168 h后，不同基因dsRNA处理组豌豆蚜的死亡率比阴性对照组高2.19倍~4.39倍，其中ds*AK*处理组豌豆蚜的死亡率为27.7%~91.1%，显著高于ds*SOD*、ds*CHS*处理组及阴性对照组。使用ds*AK*通过人工饲喂法和叶片注射饲喂法处理豌豆蚜，48 h即可出现显著致死效果。ds*AK*通过人工饲喂方法处理72 h后，豌豆蚜*AK*基因表达量比空白对照组降低43.2%，同时可抑制豌豆蚜的生长发育，使其体长比阴性对照组减少了5.9%。表明ds*AK*对豌豆蚜有较好的致死效果，在蚜虫的绿色防控方面有很好的应用前景。

关键词：豌豆蚜；RNA干扰；精氨酸激酶；超氧化物歧化酶；几丁质合成酶；dsRNA；柑橘

Screening and analysis of the pivotal RNAi target genes for the control of pea aphid *Acyrthosiphon pisum*

Zong Shixuan[1] Li Tao[1] Huang Qing[1] Cheng Baoping[2*] Zhao Hongwei[1*]

（1. College of Plant Protection, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, Jiangsu Province, China; 2. Key Laboratory of Green Prevention and Control on Fruits and Vegetables in South China, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; Guangdong Provincial Key Laboratory of High Technology for Plant Protection; Plant Protection Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, Guangdong Provice, China）

Abstract: To screen for the key RNA interference (RNAi) target genes for controlling pea aphid *Acyrthosiphon pisum*, the dsRNAs targeting three genes associated with the growth and development of *A. pisum*, namely arginine kinase (AK), superoxide dismutase (SOD), and chitin synthase (CHS), were constructed. By comparing the lethal effects of different dsRNA (ds*AK*, ds*SOD*, and ds*CHS*) treatments on *A. pisum*, and the effects of four different dsRNA delivery methods on the lethal effects of aphids, an optimized *A. pisum* control method was proposed. The results showed that after 48−168 h, the mortality rate of aphids in the treatment group was 2.19−4.39 times higher compared to the negative control group. The lethal rate of ds*AK* to aphids was 27.7%−91.13%, significantly higher than that those of ds*SOD*, ds*CHS* treatment groups and the negative control group. Significant mortality effects on *A. pisum* could be observed within 48 h after ds*AK* treatment through artificial diet feeding or feeding with leaves injected with dsRNA solution. At 72 h after treatment with ds*AK* through artificial diet feeding, the expression

基金项目：国家重点研发计划（2021YFD1400800），广东省农业科学院协同创新中心项目（XT202210），广东省现代农业产业技术体系创新团队建设项目（2023KJ113，2023KJ116），农村科技特派员项目（KTP20210278）

* 通信作者（Authors for correspondence），E-mail：chengbaoping@gdaas.cn，hzhao@njau.edu.cn

收稿日期：2022-05-22

of *AK* gene in *A. pisum* was reduced by 43.2% compared with blank control, while it also suppressed the growth and development of aphids, resulting in a 5.9% decrease in body length compared to the negative control. The results indicated that ds*AK* exhibited a significant lethal effect on pea aphids, showing promising prospects for its application in environment-friendly aphid prevention and control.

Key words: *Acyrthosiphon pisum*; RNAi; arginine kinase; superoxide dismutase; chitin synthase; dsRNA; citrus

豌豆蚜 *Acyrthosiphon pisum* 为半翅目蚜科昆虫，可为害豌豆 *Pisum sativum*、柑橘 *Citrus reticulata* 及苜蓿 *Medicago sativa* 等多种作物。豌豆蚜具有繁殖速度快、数量大、寄主范围广和抗药性强等特性，还可以传播豌豆耳突花叶病毒（pea enation mosaic virus，PEMV）、柑橘衰退病毒（citrus tristeza virus，CTV）和苜蓿花叶病毒（alfalfa mosaic virus，AMV）等病原物，造成巨大的经济损失（Jurík et al.，1980；Muniz et al.，2014；Bera et al.，2020）。目前豌豆蚜的防控主要依赖化学农药，但常常出现化学农药乱用、滥用的问题，导致蚜虫抗药性不断增长，环境农药残留超标常有发生，急需开发绿色防控新方法。

RNA干扰（RNA interference，RNAi）是一种基因沉默现象，是由21~24核苷酸长度的小分子RNA识别并结合具有反向互补序列的mRNA而导致其发生特异性降解或翻译阻滞（肖蓓等，2021）。RNAi可通过转基因表达小分子RNA前体或外源施加前体dsRNA等方式来实现，具有沉默效率高、特异性强和绿色环保等特点。一些dsRNA对昆虫生长发育关键基因的RNAi可产生致死效应，因此在农业昆虫病害防治中具有较大的应用潜力（齐恩芳等，2019；晁子健等，2020；Yan et al.，2021）。例如，在转基因玉米 *Zea mays* 中表达 *VATPase-A* 的dsRNA后，产生的RNAi效应可导致取食玉米的甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* 死亡（Baum et al.，2007）。在转基因拟南芥 *Arabidopsis thaliana* 和烟草 *Nicotiana tabacum* 中表达P450基因的dsRNA后，使用其叶片饲喂棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 可干扰其幼虫P450基因的表达，降低幼虫对棉酚的耐受性，导致其生长发育迟缓（Mao et al.，2007）。2017年，美国环保署批准了第1个基于RNAi的害虫防治产品SmartStax PRO®，是RNAi防治技术产业化的重要进展（Head et al.，2017；王康旭等，2021）。

不同种类的昆虫、不同的昆虫靶基因以及不同的dsRNA递送方式（显微注射、饲喂和浸泡等）等都会影响dsRNA对昆虫的致死效果（Cooper et al.，2019；肖蓓等，2021）。本研究在豌豆蚜体内克隆精氨酸激酶（arginine kinase，AK）、超氧化物歧化酶（superoxide dismutase，SOD）和几丁质合成酶（chitin synthase，CHS）这3个与豌豆蚜生长发育相关基因，制备各基因相应的dsRNA（ds*AK*、ds*SOD*和ds*CHS*），测定3个dsRNA对豌豆蚜的致死效应，并比较4种不同的dsRNA递送方式对其致死效果的影响，筛选获得防治效果明显的dsRNA及其递送方式，以期为基于RNAi技术的蚜虫绿色防控技术开发提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试虫源、菌株及载体：豌豆蚜采自本实验室温室栽培的砂糖橘和甜橙等植物上，饲养条件为温度（22±2）℃、相对湿度75%、光照周期16 L∶8 D，取3龄若虫供试。砂糖橘和甜橙由广东省农业科学院提供。大肠杆菌 *Escherichia coli* 菌株DH5α和HT115（DE3）、载体L4440均由本实验室保存并提供。绿色荧光蛋白（green fluorescent protein，GFP）基因从本实验室保存的pUC57-GFP质粒上扩增获得。

供试培养基：LB（Luria-Bertani）液体培养基由10 g胰蛋白胨、5 g酵母提取物、10 g氯化钠、1 000 mL蒸馏水配制而成；添加15 g琼脂粉即为LB固体培养基，pH 7.0。

试剂及仪器：高保真DNA聚合酶、2×Phanta Max Master Mix（Dye Plus）、荧光定量试剂AceQ qPCR SYBR Green Master Mix（Low ROX premixed），南京诺唯赞生物科技公司；RNA提取试剂TRIzol、PrimeScript™反转录试剂盒、DL5000 DNA Marker，日本TaKaRa公司；DNA凝胶回收试剂盒，Axygene公司；限制性内切酶FastDigest *Sac* I、FastDigest *Xho* I、DNase I溶液、RNase A溶液，美国Thermo公司；异丙基-β-D-硫代半乳糖苷（isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside，IPTG），金克隆生物公司；盐酸四环素、氨苄青霉素，索莱宝科技有限公司；其他试剂均为国产分析纯。Nikon SMZ25体式显微镜，尼康精机有限公司；PH-070A型恒温培养箱，上海一恒科学仪器有限公司；DYY-6C型核酸电泳仪，

北京六一生物科技有限公司；T100™ Thermal Cycler PCR仪，美国Bio-Rad公司；Nano-Drop ND-2000分光度仪，美国Thermo公司；Applied Biosystems 7500 System荧光定量PCR仪，美国Invitrogen公司。

1.2 方法

1.2.1 待测靶标基因的克隆与载体的构建

在NCBI（https://www.ncbi.nlm.nih.gov）数据库中获取豌豆蚜的靶标基因*AK*、*SOD*、*CHS*编码序列（coding sequence，CDS）的全长序列，设计含有酶切位点的引物（表1）。本试验所用引物均由南京金斯瑞生物科技股份有限公司合成。*AK*、*SOD*和*CHS*扩增片段大小分别为400、245和360 bp。GenBank登录号分别为XM_008187305.3、NM_001162771.1和XM_01680798-3.2。

表1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in this study

引物名称 Primer name	引物序列（5′–3′） Primer sequence (5′–3′)	引物用途 Purpose
GFP-F	CGAGCTCGCAACTTGTCTGGTGTCAAAAATAATA	基因克隆及重组载体鉴定 Gene cloning and recombinant vector identification
GFP-R	CCTCGAGGCGCCTGATGCGGTATTTT	
AK-F	CGAGCTCGGGATTTGAAAACCATGATTCG	
AK-R	CCTCGAGGCGTGGAAGAAACCTTATCCTCTATC	
CHS-F	CGAGCTCGATGACGTCACGTTTGTCGTT	
CHS-R	CCTCGAGGGAATGTGACGACGCGATCA	
SOD-F	CGAGCTCGAACGTGACATTTATCCAGGCTAA	
SOD-R	CCTCGAGGCGTGATCGGATCAAGGATT	
L4440-F	AGCGAGTCAGTGAGCGAG	
qAK-F	GCTCCTGATGCTGATGCGTACAC	实时荧光定量PCR qRT-PCR
qAK-R	ATCACCAAGTGTGTTCACGTCACC	
actin-F	GGAAAGAGATGAGGTCCGTTTAG	
actin-R	CTACTTGGTTCACACCACGAATA	

下划线部分为酶切位点及保护碱基序列。The underlined parts indicate the restriction sites plus protective bases.

取30头3龄豌豆蚜虫，利用TRIzol试剂提取总RNA，再利用PrimeScript™反转录试剂盒以1 μg总RNA为模板反转录获得第一链cDNA。然后以cDNA为模板扩增豌豆蚜的*AK*、*CHS*和*SOD*基因片段。PCR反应体系：2×Phanta Max Master Mix 25 μL、10 μmol/L各基因片段对应上下游引物（表1）各2 μL、cDNA模板1 μL，无RNase水补足至50 μL。PCR反应程序：95 ℃预变性5 min；95 ℃变性15 s，60 ℃退火15 s，72 ℃延伸30 s，共35个循环；72 ℃最后延伸5 min，4 ℃保存。PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳检测后使用DNA凝胶回收试剂盒进行回收。利用*Sac* I和*Xho* I对该目的条带和L4440载体进行双酶切处理。酶切产物经纯化后，再利用T4 DNA Ligase将靶标基因片段与L4440载体于16 ℃过夜连接，最后将连接产物转化至大肠杆菌菌株HT115（DE3）中。测序正确的菌株置于甘油中保存。

1.2.2 在大肠杆菌HT115（DE3）中诱导表达dsRNA

将含有*AK*、*CHS*和*SOD*基因片段的重组大肠杆菌菌株接种到含有50 μg/mL氨苄青霉素和12.5 μg/mL盐酸四环素的LB液体培养基中，并于37 ℃、220 r/min过夜培养。初培液与LB液体培养基按照体积比4∶100混合，并在相同条件下继续扩培3 h，至$OD_{600\,nm}$为0.6~0.8时，加入0.5 mmol/L IPTG，在同样条件下诱导培养4~5 h。使用TRIzol试剂提取重组大肠杆菌的总RNA，并分别用DNase I和RNase A消化处理去除DNA和单链RNA，从而获得*AK*、*CHS*和*SOD*基因的dsRNA。

1.2.3 高效致死率靶标基因的筛选

参照Prosser & Douglas（1992）方法并稍作修改，配制蚜虫人工饲料。将30头豌豆蚜3龄若蚜放入50 mL离心管中，用封口膜封住离心管，设置3个处理组，处理组1在膜上滴加含有10%（*V*/*V*）人工饲料和400 ng/μL ds*AK*的溶液；处理组2在膜上滴加含有10%（*V*/*V*）人工饲料和400 ng/μL ds*SOD*的溶液；处理组3在膜上滴加含有10%（*V*/*V*）人工饲料和400 ng/μL ds*CHS*的溶液，再用封口膜包裹住溶液。分别以滴加等量含有10%（*V*/*V*）人工饲料的溶液为空白对照，以滴加等量含有10%（*V*/*V*）人工饲料和

ds*GFP*的溶液为阴性对照）。离心管底部和管壁用锡纸包裹，离心管顶部为封口膜封闭的透光结构，将离心管中的蚜虫置于温度（22±2）℃、相对湿度75%、光周期16 L∶8 D的光照培养箱中饲养（载有饲料的一端朝上）。每组设3个生物学重复，每24 h更换溶液，记录蚜虫死亡数量，并计算死亡率。

1.2.4 dsRNA不同递送方式对其致死效果的影响测定

本试验设置4种不同的dsRNA递送方法，测定经不同方法处理后蚜虫的死亡率。dsRNA递送方式1和方式2中，配制含有10%（*V*/*V*）人工饲料和400 ng/μL dsRNA的溶液。dsRNA递送方式3和方式4中，配制不含人工饲料，含有400 ng/μL dsRNA的溶液。

dsRNA递送方式1：人工饲喂法。将30头3龄若蚜放入50 mL离心管中，用封口膜封住离心管，处理组在膜上滴加含有人工饲料和ds*AK*的溶液200 μL，再用封口膜包裹住溶液。分别以滴加等量含有10%（*V*/*V*）人工饲料的溶液为空白对照（CK1），以滴加等量含有10%（*V*/*V*）人工饲料和ds*GFP*的溶液为阴性对照。离心管底部和管壁用锡纸包裹，离心管顶部为封口膜封闭的透光结构，将离心管中的蚜虫置于温度（22±2）℃、相对湿度75%、光周期16 L∶8 D的光照培养箱中饲养（载有饲料的一端朝上）。每组设3个生物学重复，每24 h更换溶液，连续处理至168 h，每24 h观察记录蚜虫死亡数量，并计算死亡率。

dsRNA递送方式2：人工浸泡法。将30头豌豆蚜3龄若蚜置于铺有滤纸的无菌培养皿中，处理组在滤纸上滴加含有人工饲料和ds*AK*的溶液200 μL。同时分别以滴加等量含有10%（*V*/*V*）人工饲料的溶液为空白对照，以滴加等量含有10%（*V*/*V*）人工饲料和ds*GFP*的溶液为阴性对照。蚜虫置于含液体药剂的滤纸上，用保鲜膜封住培养皿，置于温度（22±2）℃、相对湿度75%、光周期16 L∶8 D的光照培养箱中饲养。每组设3个生物学重复，每24 h更换滤纸及溶液，连续处理至168 h，每24 h观察记录蚜虫死亡数量，并计算死亡率。

dsRNA递送方式3：叶片浸泡法。在15 mL离心管盖中滴加含有ds*AK*的溶液200 μL。于离心管中放入与管盖大小一致直径约为22.6 mm的圆形柑橘嫩叶叶碟，使叶碟浸泡于溶液中，将30头豌豆蚜3龄若蚜接入叶片上，用保鲜膜封住管盖，置于温度（22±2）℃、相对湿度75%、光周期16 L∶8 D的光照培养箱中饲养。分别以滴加等量无RNase水作空白对照，滴加等量含有ds*GFP*的溶液作为阴性对照。每组均设3个生物学重复，每24 h更换叶片和溶液，连续处理至168 h，每24 h观察记录蚜虫死亡数量，并计算死亡率。

dsRNA递送方式4：叶片注射饲喂法。选择一片柑橘嫩叶，将含有ds*AK*的溶液200 μL注入叶片中，将30头豌豆蚜3龄若蚜接于叶片上，放置于垫有滤纸的无菌培养皿中，在滤纸上滴加200 μL无RNase水，最后用保鲜膜封住培养皿，置于温度（22±2）℃、相对湿度75%、光周期16 L∶8 D的光照培养箱中饲养。以滴加等量无RNase水作空白对照，以滴加等量含有ds*GFP*的溶液作阴性对照。每组均设3个生物学重复，每24 h更换滤纸、叶片和溶液，连续处理至168 h，每24 h观察记录蚜虫死亡数量，并计算死亡率。

1.2.5 豌豆蚜靶标基因*AK*的表达量测定

配制含有10%（*V*/*V*）人工饲料和400 ng/μL ds*AK*的溶液。参照1.2.4 dsRNA递送方式1的人工饲喂法。处理组在封口处的封口膜上滴加含有10%（*V*/*V*）人工饲料和ds*AK*的溶液200 μL，以滴加等量含有人工饲料的溶液作空白对照，滴加等量含有人工饲料和ds*GFP*的溶液作阴性对照。在温度（22±2）℃、相对湿度75%、光周期16 L∶8 D的光照培养箱中饲养（载有饲料的一端朝上）。每个处理选30头豌豆蚜3龄若蚜。每组设3个生物学重复。分别取经ds*AK*处理后0、48和72 h存活的豌豆蚜3龄若蚜，使用TRIzol试剂提取RNA并反转录获得cDNA。以稀释10倍的cDNA作为模板利用实时荧光定量PCR（quantitative real time polymerase chain reaction，qRT-PCR）技术测定*AK*基因在豌豆蚜体内的表达量，以豌豆蚜核糖体蛋白基因*Rpl7*为内参基因（GenBank登录号NM_001135898）。10 μL qRT-PCR反应体系：cDNA 2 μL、10 μmol/L上下游引物（表1）各0.2 μL、2×AceQ qPCR SYBP Green Master Mix 5 μL，ddH_2O补至10 μL。反应程序：95 ℃预变性5 min；95 ℃变性10 s，60 ℃退火34 s，共40个循环。每个样品设3个生物学重复。采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法对试验数据进行分析。

1.2.6 ds*AK*处理对豌豆蚜生长发育的影响测定

参照1.2.4的递送方式1人工饲喂法，用ds*AK*处理豌豆蚜3龄若蚜，每24 h更换溶液。连续培养72 h后，使用体式显微镜观察和拍照记录豌豆蚜的生长情况。每次选取5头存活的豌豆蚜，每处理重复3次。利用ImageJ软件测量蚜虫体长。

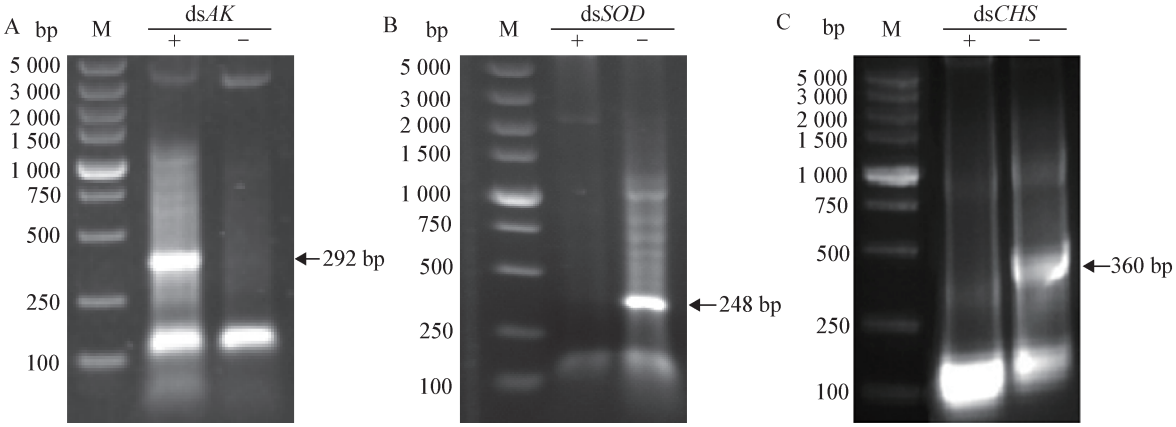
1.3 数据分析

采用Excel 2019和SPSS 19.0软件进行单因素方差分析，采用Tukey法进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 蚜虫靶标基因dsRNA的诱导表达

本试验构建了*AK*、*CHS*和*SOD*等3个基因的dsRNA表达载体并在大肠杆菌中表达。提取重组大肠杆菌的总RNA，纯化获得*AK*、*CHS*和*SOD*基因的dsRNA（ds*AK*、ds*SOD*和ds*CHS*）。电泳检测结果显示，在ds*AK*、ds*SOD*和ds*CHS*预期的位置上均出现了清晰明亮的条带，并且条带大小与dsRNA设计长度一致，表明本研究所用方法可产生高纯度dsRNA（图1）。



M：DL5000 marker。A：L4440-*AK*；B：L4440-*SOD*；C：L4440-*CHS*。+：添加IPTG；−：未添加IPTG。
M: DL5000 marker. A: L4440-*AK*; B: L4440-*SOD*; C: L4440-*CHS*. +: Addition of IPTG; −: no addition of IPTG.

图1 重组dsRNA在大肠杆菌HT115中的诱导表达

Fig. 1 Induced expression of recombinant dsRNA in *Escherichia coli*

2.2 高致死率靶标基因的筛选

通过人工饲喂法处理豌豆蚜48 h时，ds*AK*、ds*SOD*和ds*CHS*处理组豌豆蚜的死亡率分别为27.7%、6.67%和7.77%，空白对照组和阴性对照组豌豆蚜的死亡率分别为5.5%和6.7%，ds*AK*处理组均显著高于其他处理。处理72 h时，ds*AK*、ds*SOD*和ds*CHS*处理组豌豆蚜的死亡率分别为41.1%、21.1%和20.0%，空白对照组和阴性对照组豌豆蚜的死亡率分别为7.8%和9.0%，ds*AK*处理组的致死效果依然显著高于其他处理。处理96~168 h时，ds*SOD*、ds*CHS*和ds*AK*处理组豌豆蚜的死亡率均显著高于空白对照组和阴性对照组，其中ds*AK*处理组豌豆蚜的死亡率为91.1%，显著高于ds*SOD*和ds*CHS*处理组。不同基因dsRNA处理组对蚜虫的致死率比阴性对照组高2.19倍~4.39倍，其中ds*AK*处理组对蚜虫的致死效果明显优于ds*SOD*和ds*CHS*处理组（图2）。因此，本试验对ds*AK*开展了进一步研究。

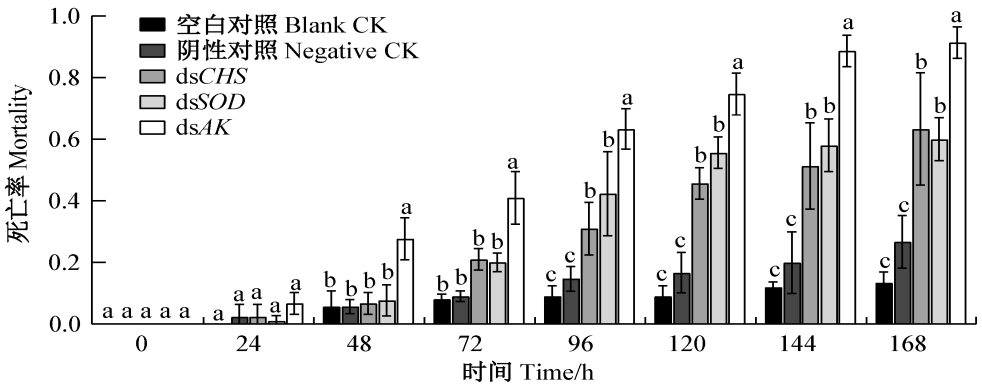


图2 人工饲喂法筛选对豌豆蚜有高致死效果的靶标基因

Fig. 2 Screening target genes with high lethality effect on *Acyrthosiphon pisum* by artificial diet feeding method

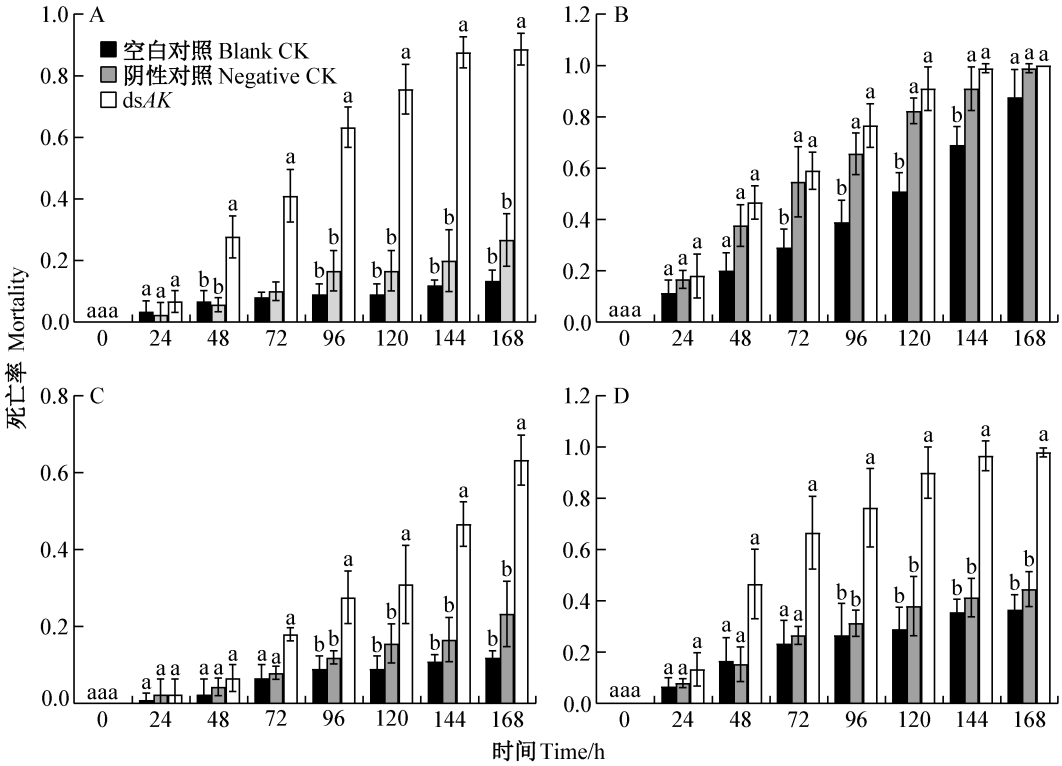
图中数据为平均数±标准差。不同小写字母表示同一时间不同处理间经Tukey法检验差异显著（$P<0.05$）。Data are mean±SD. Different letters indicate significant difference among different treatments at the same time by Tukey test ($P<0.05$).

2.3　不同的dsRNA递送方式对豌豆蚜的致死效果

人工饲喂法处理48~168 h后，ds*AK*处理组豌豆蚜的死亡率分别为25.0%、41.1%、63.29%、75.58%、87.77%和88.87%，显著高于空白对照组和阴性对照组（图3-A）。人工浸泡法处理24~48 h后，ds*AK*处理组豌豆蚜的死亡率分别为17.8%和46.67%，与空白对照组及阴性对照组相比均无显著差异；处理72~144 h后，ds*AK*处理组豌豆蚜的死亡率分别为58.9%、76.67%、91.1%、和98.9%，与空白对照组差异显著，但与阴性对照组无显著差异。处理168 h后，ds*AK*处理组豌豆蚜的死亡率为100.0%，与空白对照组和阴性对照组均无显著差异（图3-B）。

相比人工饲喂法和人工浸泡法，叶片浸泡法和叶片注射饲喂法更接近田间实际应用的情况。叶片浸泡法处理24~72 h后，ds*AK*处理组豌豆蚜的死亡率分别为2.2%、10.0%和17.8%，但与空白对照组和阴性对照组相比均无显著差异；处理96~168 h后，ds*AK*处理组豌豆蚜的死亡率分别为27.8%、31.1%、50.0%和63.3%，均显著高于空白对照组和阴性对照（图3-C）。叶片注射饲喂法处理48~168 h后，ds*AK*处理组豌豆蚜的死亡率分别为46.7%、66.7%、76.6%、90.0%、96.7%和97.8%，均显著高于空白对照组和阴性对照组（图3-D）。

综上，使用ds*AK*通过人工饲喂法和叶片注射饲喂法处理蚜虫，处理48 h即可出现显著致死效果，出现显著致死效果的时间较早，且处理组与阴性对照组间的差异较大，表明这2种dsRNA递送方式对蚜虫的致死效果较好。因此，后续试验采用人工饲喂法和叶片注射饲喂法递送dsRNA，而未采用人工浸泡法和叶片浸泡法。



A：人工饲喂法；B：人工浸泡法；C：叶片浸泡法；D：叶片注射饲喂法。图中数据为平均数±标准差。不同小写字母表示同一时间不同处理间经Tukey法检验差异显著（$P<0.05$）。A: Artificial diet feeding treatment; B: artificial immersion treatment; C: feeding with leaves soaked in dsRNA solution; D: feeding with leaves injected with dsRNA solution. Data are mean±SD. Different letters indicate significant difference among different treatments at the same time by Tukey test ($P<0.05$).

图3　4种不同dsRNA递送方式处理对豌豆蚜的致死效果

Fig. 3　The lethal effects of four different dsRNA delivery methods on *Acyrthosiphon pisum*

2.4　ds*AK*处理后靶标基因的表达量分析

使用荧光定量PCR法检测了人工饲喂ds*AK*对豌豆蚜靶标基因*AK*的沉默效率，结果表明，ds*AK*处理48 h和72 h后，处理组*AK*的表达量比空白对照分别降低24.5%和43.2%，比阴性对照组分别降低20.7%和38.5%，且处理组与空白对照组和阴性对照组均差异显著（图4）。表明ds*AK*可显著抑制豌豆蚜体内靶标基因*AK*的表达。

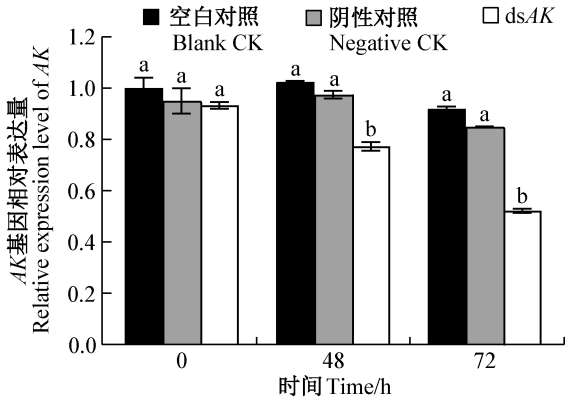


图4 人工饲喂法处理后豌豆蚜*AK*基因相对表达量

Fig. 4 Relative expression of *AK* gene of *Acyrthosiphon pisum* by using artificial diet feeding method

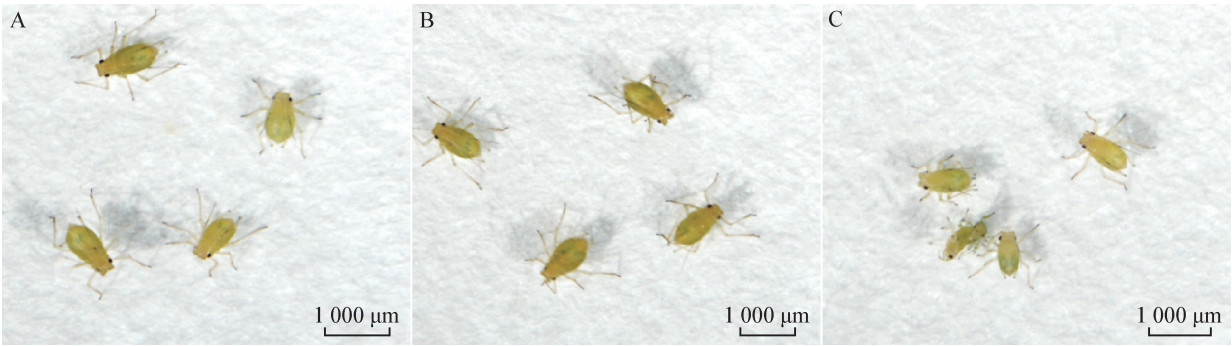
图中数据为平均数±标注差。不同小写字母表示同一时间不同处理间经Tukey法检验差异显著(P<0.05)。Data are mean±SD. Different letters indicate significant difference by Tukey test (P<0.05).

2.5 ds*AK*处理对豌豆蚜生长发育的影响

使用ds*AK*通过人工饲喂法处理豌豆蚜72 h后，豌豆蚜平均体长为753.6 μm，而空白对照组和阴性对照分别为815.7 μm和800.7 μm。与空白对照组相比，ds*AK*处理组豌豆蚜虫体长显著减少了7.6%，与阴性对照组相比显著减少了5.9%。ds*AK*处理组豌豆蚜的生长发育受到抑制，发育减缓，身体蜷缩，个体变小(图5)。

3 讨论

目前，防治蚜虫主要依赖化学农药，而化学农药长期过量施用容易产生3R问题(抗性、再猖獗和残留)，对环境危害大，还对人类健康产生有害影响。因此，发展绿色、便捷、高效的新型蚜虫防控技术迫在眉睫。RNAi技术具有设计简单、沉默效率高、特异性强和绿色环保等特点，昆虫生长发育关键基因的RNAi可产生致死效应，因此这项技术在农业病虫防治中具有极大的应用潜力。筛选蚜虫体内有致死效应的RNAi靶标基因，是利用RNAi技术防治蚜虫中的首要问题，本研究通过文献检索找到了*AK*、*SOD*和*CHS*这三个与蚜虫生长发育相关的重要基因(Qi et al., 2015;Taning et al., 2016;Galdeano et al., 2017)。



A：未饲喂dsRNA的蚜虫；B：饲喂ds*GFP*的蚜虫；C：饲喂ds*AK*的蚜虫。A: Aphids fed without dsRNA; B: aphids fed with ds*GFP*; C: aphids fed with ds*AK*.

图5 人工饲喂法处理蚜虫后的形态

Fig. 5 Morphology of aphids after treatment by using artificial diet feeding method

*AK*基因与昆虫的肌肉收缩、细胞分裂及能量代谢等相关，Qi et al.(2015)研究表明使用ds*AK*饲喂棉铃虫可显著提高对幼虫的致死率，延缓幼虫化蛹。Zhao et al.(2008)研究发现，黄曲条跳甲*Phyllotreta striolata*饲喂ds*AK*后，其繁殖力和生育力均受到损害。本研究合成了豌豆蚜*AK*基因的dsRNA，饲喂法处理豌豆蚜72 h后，其对豌豆蚜靶标基因的沉默效率可以达到38.5%，并显著提高了致死效果，同时豌豆蚜的生长发育也受到了显著影响，这表明豌豆蚜*AK*基因可能是蚜虫能量代谢、肌肉收缩及生长发育等过程的关键酶，沉默靶标基因*AK*的表达后，蚜虫体内的能量代谢和生长发育相关基因可能也受到了抑制。后续研究拟检测豌豆蚜体内*AK*基因相关代谢酶在这一过程中的活性，以进一步验证*AK*基因的作用。

*SOD*基因编码SOD，可有效清除昆虫体内的自由基，还能特异性清除超氧自由基对细胞的损害(Taning et al., 2016)。Taning et al.(2016)研究发现饲喂ds*SOD*对亚洲柑橘木虱*Diaphorina citri*有较强的诱导死亡和抑制靶标基因的作用。*CHS*基因编码CHS，而几丁质则是昆虫表皮和真菌细胞壁的特征成分(Galdeano et al., 2017)。Galdeano et al.(2017)研究表明使用含有ds*CHS*的人工饲料饲喂亚洲柑橘木虱，对若虫和成虫有非常显著的致死效

应。本研究使用ds*SOD*和ds*CHS*处理豌豆蚜对其也有一定的致死效果，但作用较弱。可能是由于豌豆蚜和亚洲柑橘木虱的虫体结构、肠道核酸酶分布位置、肠道pH、dsRNA剪切形式等不同，影响了dsRNA对豌豆蚜*SOD*和*CHS*基因的RNAi效应，从而产生差异。

目前，递送dsRNA到昆虫体内的方式主要包括饲喂法和表皮渗透法（注射、浸泡）（Yu & Killiny，2018；肖蓓等，2021）。Whyard et al.（2009）研究表明，使用饲喂法递送dsRNA操作简单，易于实现。本研究表明，纯人工环境下的2种小RNA递送方法中，人工饲喂法递送dsRNA确实较易操作，也有较好的效果，适用于前期蚜虫RNAi筛选试验。Whyard et al.（2009）将黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster*幼虫浸泡于含有*β*-葡萄糖醛酸酶基因dsRNA中，导致葡萄糖醛酸酶的活性降低50%。而本研究的dsRNA人工浸泡法试验中，对照组豌豆蚜的死亡率较高，处理组和对照组无显著差异，效果较差，可能是由于黑腹果蝇幼虫与豌豆蚜对浸泡的耐受性不同，豌豆蚜完全浸泡在药剂中不利于其生存。近期研究报道显示，加入纳米佐剂并使用背板滴定法开展蚜虫RNAi试验的效果较好（Yan et al.，2020a；Li et al.，2022；Ma et al.，2022），后续值得进一步探索试验。前人通过植物叶片直接施用dsRNA来防治蚜虫、粉虱和螨类时有较好的效果（龚流娥等，2023）。本研究使用了叶片浸泡法和叶片注射饲喂法来递送小RNA，结果表明叶片注射饲喂法对豌豆蚜的致死效果好于叶片浸泡法。该结果可能是因为叶片注射饲喂法中的dsRNA可以更好地渗入植物组织并被豌豆蚜吸收。此外，考虑到dsRNA药剂的叶片注射或吊针注射适合应用于柑橘等果树类农作物，因此叶片注射法比人工饲喂法更接近实际应用。随着纳米科学的不断发展，一些生产成本较低的纳米材料被用于农药佐剂制作，可以提高dsRNA穿透害虫体壁的能力和RNAi效率，可以制成RNA农药，有较好的田间应用前景（Yan et al.，2020b；付淑笙等，2021）。

综上所述，本研究发现，*AK*基因的dsRNA对豌豆蚜有较好的致死效果。本研究中的ds*AK*药剂还具有设计简单、沉默效率较高、特异性较强、绿色环保等特点。鉴于蚜虫科昆虫生长发育相关基因的序列保守性，本研究可为基于RNAi的作物蚜虫绿色防控技术开发提供科学依据，在柑橘、豌豆等作物的蚜虫防控及由其传播的柑橘衰退病、豌豆耳突花叶病等病毒病的防控方面有一定应用前景。

参 考 文 献（References）

Baum JA, Bogaert T, Clinton W, Heck GR, Feldmann P, Ilagan O, Johnson S, Plaetinck G, Munyikwa T, Pleau M, et al. 2007. Control of coleopteran insect pests through RNA interference. Nature Biotechnology, 25(11): 1322−1326

Bera S, Blundell R, Liang D, Crowder DW, Casteel CL. 2020. The oxylipin signaling pathway is required for increased aphid attraction and retention on virus-infected plants. Journal of Chemical Ecology, 46(8): 771−781

Chao ZJ, Yan S, Shen J. 2020. Potential RNAi target lethal genes of fall armyworm *Spodoptera frugiperda* and the application and prospect of nanocarrier-mediated RNAi technology. Journal of Plant Protection, 47(4): 698−705 (in Chinese) [晁子健, 闫硕, 沈杰. 2020. 草地贪夜蛾潜在RNAi靶标致死基因及纳米载体介导RNAi技术的应用和展望. 植物保护学报, 47(4): 698−705]

Cooper AM, Silver K, Zhang JZ, Park Y, Zhu KY. 2019. Molecular mechanisms influencing efficiency of RNA interference in insects. Pest Management Science, 75(1): 18−28

Fu SS, Jiang YZ, Jiang QH, Shen J, Yan S. 2021. Research progress in nano-delivery system-based RNA pesticides and transgenic plants. Journal of Plant Protection, 48(2): 267−274 (in Chinese) [付淑笙, 江奕舟, 蒋沁宏, 沈杰, 闫硕. 2021. 基于纳米递送系统的RNA农药及转基因植物研究进展. 植物保护学报, 48(2): 267−274]

Galdeano DM, Breton MC, Lopes JRS, Falk BW, Machado MA. 2017. Oral delivery of double-stranded RNAs induces mortality in nymphs and adults of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*. PLoS ONE, 12(3): e0171847

Gong LE, Ying SM, Zhang YF, Wang JY, Sun GC. 2023. Strategies for exogenous RNA delivery in RNAi technology for plant pest control. Chinese Journal of Biotechnology, 39(2): 459−471 (in Chinese) [龚流娥, 应淑敏, 张雅芬, 王教瑜, 孙国昌. 2023. 病虫害RNAi技术中的外源RNA递送策略. 生物工程学报, 39(2): 459−471]

Head GP, Carroll MW, Evans SP, Rule DM, Willse AR, Clark TL, Storer NP, Flannagan RD, Samuel LW, Meinke LJ. 2017. Evaluation of SmartStax and SmartStax PRO maize against western corn rootworm and northern corn rootworm: efficacy and resistance management. Pest Management Science, 73(9): 1883−1899

Jurík M, Mucha V, Valenta V. 1980. Intraspecies variability in transmission efficiency of stylet-borne viruses by the pea aphid (*Acyrthosiphon pisum*). Acta Virologica, 24(5): 351−357

Li M, Ma ZZ, Peng M, Li L, Yin M, Yan S, Shen J. 2022. A gene and drug co-delivery application helps to solve the short life disadvantage of RNA drug. Nano Today, 43: 101452

Ma ZZ, Zheng Y, Chao ZJ, Chen HT, Zhang YH, Yin MZ, Shen J, Yan S. 2022. Visualization of the process of a nanocarrier-mediated gene delivery: stabilization, endocytosis and endosomal escape of

genes for intracellular spreading. Journal of Nanobiotechnology, 20(1): 124

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. Nature Biotechnology, 25(11): 1307−1313

Muniz FR, Souza A, Harakava R, Assis Alves Mourão Filho F, Stach-Machado DR, Rezende JAM, Febres VJ, Moore GA, Mendes BMJ. 2014. Reaction of transgenic *Citrus sinensis* plants to *Citrus tristeza virus* infection by *Toxoptera citricida*. European Journal of Plant Pathology, 139(1): 151−159

Prosser WA, Douglas AE. 1992. A test of the hypotheses that nitrogen is upgraded and recycled in an aphid (*Acyrthosiphon pisum*) symbiosis. Journal of Insect Physiology, 38(2): 93−99

Qi EF, Jia XX, Liu S, Chen XY, Wen GH, Hu XY. 2019. Production of transgenic potato plants resistant to four viruses via RNAi-mediated virus resistance. Journal of Plant Protection, 46(1): 192−200 (in Chinese) [齐恩芳, 贾小霞, 刘石, 陈晓艳, 文国宏, 胡新元. 2019. 利用RNA干扰介导抗病性获得兼抗四种病毒的转基因马铃薯. 植物保护学报, 46(1): 192−200]

Qi XL, Su XF, Lu GQ, Liu CX, Liang GM, Cheng HM. 2015. The effect of silencing arginine kinase by RNAi on the larval development of *Helicoverpa armigera*. Bulletin of Entomological Research, 105(5): 555−565

Taning CNT, Andrade EC, Hunter WB, Christiaens O, Smagghe G. 2016. Asian citrus psyllid RNAi pathway-RNAi evidence. Scientific Reports, 6: 38082

Wang KX, Chen EH, Tang PA. 2021. Application of RNAi in management of stored grain pest: research progress and prospective. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 36(10): 181−187 (in Chinese) [王康旭, 陈二虎, 唐培安. 2021. RNAi在储粮害虫防治应用中的研究现状及展望. 中国粮油学报, 36(10): 181−187]

Whyard S, Singh AD, Wong S. 2009. Ingested double-stranded RNAs can act as species-specific insecticides. Insect Biochemistry Molecular Biology, 39(11): 824−832

Xiao B, Xing SS, Deng D, Peng W, Zhai ZZ. 2021. Progress in research on the use of RNAi delivery systems in pest control. Chinese Journal of Applied Entomology, 58(4): 764−782 (in Chinese) [肖蓓, 幸诗斯, 邓丹, 彭威, 翟宗昭. 2021. RNAi递送系统在害虫防治中的研究进展. 应用昆虫学报, 58(4): 764−782]

Yan S, Qian J, Cai C, Ma ZZ, Li JH, Yin MZ, Ren BY, Shen J. 2020a. Spray method application of transdermal dsRNA delivery system for efficient gene silencing and pest control on soybean aphid *Aphis glycines*. Journal of Pest Science, 93(1): 449−459

Yan S, Ren BY, Shen J. 2021. Nanoparticle-mediated double-stranded RNA delivery system: a promising approach for sustainable pest management. Insect Science, 28(1): 21−34

Yan S, Ren BY, Zeng B, Shen J. 2020b. Improving RNAi efficiency for pest control in crop species. BioTechniques, 68(5): 283−290

Yu XD, Killiny N. 2018. RNA interference of two glutathione *S*-transferase genes, *Diaphorina citri DcGSTe2* and *DcGSTd1*, increases the susceptibility of Asian citrus psyllid (Hemiptera: Liviidae) to the pesticides fenpropathrin and thiamethoxam. Pest Management Science, 74(3): 638−647

Zhao YY, Yang G, Wang-Pruski GF, You MS. 2008. *Phyllotreta striolata* (Coleoptera: Chrysomelidae): arginine kinase cloning and RNAi-based pest control. European Journal of Entomology, 105 (5): 815−822

（责任编辑：王 璇）