

干扰 *TcRXR2* 对朱砂叶螨卵期的致死效果分析*

饶腾悦** 马 婷 申光茂 张 赞***

(西南大学植物保护学院, 重庆 400715)

摘 要 【目的】基于 RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 技术筛选朱砂叶螨 *Tetranychus cinnabarinus* 卵孵化过程中的关键基因, 为开发靶向朱砂叶螨卵期的 RNAi 控制技术奠定基础。【方法】通过基因克隆、序列分析和 qPCR 分析, 筛选出在朱砂叶螨卵期特异性表达的基因 (类视黄醇 X 受体 2, Retinoid X receptor 2, *TcRXR2*), 并应用 RNAi, 表型观察分析干扰 *TcRXR2* 基因表达后, 对朱砂叶螨各个发育过程的影响。【结果】克隆获得了 *TcRXR2* 的全长序列, 开放阅读框长度为 1 293 bp, 可编码氨基酸为 430 aa, 具有核受体的 DNA 结合域 (DNA-binding domain, DBD) 和配体结合域 (Ligand binding domain, LBD)。 *TcRXR2* 在第二若螨阶段高表达, 在其他阶段无显著性差异 ($P>0.05$), 但是进一步检测其在不同日龄卵中的表达发现, *TcRXR2* 在卵后期表达量显著提高 ($P<0.05$)。在连续饲喂 ds*TcRXR2* 的条件下, 朱砂叶螨幼螨仍能成功发育为成螨, 使用点滴 ds*TcRXR2* 的方式处理卵则可显著影响卵的孵化 ($P<0.05$), 具有致死效应。这些结果表明, *TcRXR2* 基因是影响朱砂叶螨卵孵化的特异性 RNAi 靶点。【结论】研究找到了一个对朱砂叶螨卵期具有致死效应 RNAi 靶点, 为利用 RNAi 技术防治朱砂叶螨奠定了基础。

关键词 RNA 干扰; 朱砂叶螨; 害螨防治; 类视黄醇 X 受体 2

Analysis of the lethal effect of RNA interfering with *TcRXR2* on the egg stage of *Tetranychus cinnabarinus*

RAO Teng-Yue** MA Ting SHEN Guang-Mao ZHANG Zan***

(College of Plant Protection, Southwest University, Chongqing 400715, China)

Abstract [Aim] To utilize RNA interference (RNAi) technology to identify crucial genes involved in the hatching process of *Tetranychus cinnabarinus*, and thereby lay the groundwork for the development of targeted RNAi control techniques specifically aimed at the egg stage of this pest. [Methods] Genes specifically expressed during the egg stage of *T. cinnabarinus* were screened using gene cloning, sequence analysis, and qPCR. One, the retinoid X receptor 2 (*TcRXR2*), was identified and subjected to RNAi. Phenotypic observations were conducted to analyze the impact of RNAi on *TcRXR2* gene expression in various developmental stages of *T. cinnabarinus*. [Results] The full-length sequence of *TcRXR2* was successfully cloned, with an open reading frame of 1 293 bp, encoding 430 amino acids. It features a nuclear receptor DNA-binding domain (DBD) and a ligand-binding domain (LBD). *TcRXR2* was highly expressed during the second nymph stage, with no significant differences in expression in other stages ($P<0.05$). However, further examination of its expression during egg development revealed that its expression significantly increased as development progressed. Nymphs that were continuously fed ds*TcRXR2* were still able to successfully develop into mites. However, the treatment of eggs with dots of ds*TcRXR2* significantly affected hatching, demonstrating a lethal effect on embryos. These results suggest that the *TcRXR2* gene is a specific RNAi target that influences the hatching of *T. cinnabarinus* eggs. [Conclusion] A specific RNAi target with lethal effects on the eggs of *T. cinnabarinus*, was successfully identified, thereby providing a foundation for utilizing RNAi technology to control this pest.

Key words RNA interference; *Tetranychus cinnabarinus*; pest mite control; retinoid X receptor 2

*资助项目 Supported projects: 云南省科技厅科技计划项目 (202202AE090010); 国家自然科学基金面上项目 (32272627)

**第一作者 First author, E-mail: tengyuerao@163.com

***通讯作者 Corresponding author, E-mail: zhangzan125@hotmail.com

收稿日期 Received: 2024-01-10; 接受日期 Accepted: 2024-03-21

植食性螨是诸多农作物上的重要有害生物,其寄主范围可达 140 科的 1 200 余种植物 (Migeon *et al.*, 2010)。朱砂叶螨 *Tetranychus cinnabarinus* 是一种常见的植食性害螨,也被认为是二斑叶螨 *T. urticae* 的异名 (Auger *et al.*, 2013),可为害棉花、花卉和蔬菜等多种经济作物 (Sertkaya *et al.*, 2010; Grbić *et al.*, 2011; Ouyang *et al.*, 2018)。当前害螨的防控以化学防治为主,然而由于螨繁殖能力强、世代周期短,它们对田间常用的拟除虫菊酯类、线粒体复合物抑制剂类以及螺螨酯、乙螨唑等常用杀虫剂和杀螨剂都产生了很高抗性 (Stumpf and Nauen, 2001; He *et al.*, 2008; Van Leeuwen *et al.*, 2010; 戴宇婷等, 2013; 王保军等, 2019)。抗性问题导致化学农药对螨防治效果降低的同时,也使田间农药的使用量增加,给环境安全带来了沉重负担。因此,开发新型环保、安全且高效的害虫防治技术具有迫切的需求,也是当前研究的热点。

RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 的机制是以外源性双链 RNA (dsRNA) 为活性物,触发生物体内互补 mRNA 的降解 (Fire *et al.*, 1998)。RNAi 是一种在分子水平上直接修饰生物体过程的方法,已经被广泛应用于功能基因组学研究 (Jain *et al.*, 2020)、疾病治疗 (Liao and Tang, 2016; Saw and Song, 2020) 以及害虫防治 (Choudhary *et al.*, 2021) 等领域。高效的 RNAi 可以大量减少生物体内功能蛋白的量,进而导致与其功能相关的生理过程和组织结构出现异常。比如靶向节肢动物发育过程中关键基因的 RNAi,可以引起害虫幼虫畸变或者不能顺利蜕皮 (Xu *et al.*, 2019, 2021a, 2021b; Qu *et al.*, 2022; Zhang *et al.*, 2022)。靶向害虫解毒代谢系统的 RNAi 既是研究相关基因功能的重要工具,也具备被开发成抗性治理方法的潜力 (Hough *et al.*, 2022)。因此,该技术作为一种新型有害生物控制方法,被认为在未来植物保护领域具有巨大的应用潜力,并且近年来已经逐渐开始有市场化的应用 (Head *et al.*, 2017; Rodrigues *et al.*, 2021)。将 RNAi 用于害虫防治的一大优势在于以核酸作为活性物质以及靶向特定的基因作用方式,相较

传统化学防治而言具有更强的特异性和环境安全性 (Jiang *et al.*, 2017; Sun *et al.*, 2019)。将 RNAi 应用于害虫防控,除了作用方式外,其递送方式也是影响最终效果的重要因素。目前有多种途径可将 dsRNA 递送至生物体内,包括饲喂、浸泡和注射 (Kumar *et al.*, 2008; Powell *et al.*, 2017; Niu *et al.*, 2018)。同时,利用转基因的方式让植物可以直接表达靶向特定基因的 dsRNA,也是一种实现 RNAi 控虫的有效途径 (Zhang *et al.*, 2017; Rodrigues *et al.*, 2021)。而无论采用哪种递送方式,开展 RNAi 防治的第一步都是筛选合适的靶基因。

针对害螨的 RNAi,已建立了成熟的技术体系,可以通过饲喂、注射和浸泡成功递送 dsRNA。前期研究发现,沉默相关蛋白基因能够导致朱砂叶螨的高死亡率,并且多个基因结合对死亡率有协同作用 (Kwon *et al.*, 2016)。蜕皮激素受体表达的降低可能会阻断朱砂叶螨幼螨发育为成螨 (Shen *et al.*, 2019)。因此,筛选致死基因和研究致死机制是有效控制 RNAi 的重要基础。在此基础上,本研究通过 RNAi 技术进一步筛选能够影响朱砂叶螨特定发育阶段的关键靶标基因,丰富害螨 RNAi 防控的靶基因库。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

本试验中使用的朱砂叶螨种群最初采集于中国重庆市北碚区田间豇豆叶片上,在不接触任何农药的条件下,使用豇豆叶 *Vigna unguiculata* 在培养箱 (GLD-260B-3, 宁波乐电仪器制造有限公司) 中持续饲养了 19 年以上。整个试验过程中,环境条件保持恒定,温度控制在 $(26 \pm 1) ^\circ\text{C}$,光周期为 14 L : 10 D,湿度保持在 50%-70%。

1.2 朱砂叶螨不同发育阶段样品的收集和总 RNA 提取

采用叶碟法收集朱砂叶螨不同发育阶段样品,具体操作参考 Kwon 等 (2013) 方法,步骤为:在 12 cm 的培养皿中放置海绵,表面铺上滤

纸, 然后在海绵周围加水, 使滤纸保持湿润。将豇豆叶 (2 cm × 2 cm) 放在滤纸上, 再将 50 头雌成螨转移到每片叶子上, 待雌成螨在叶碟上产卵 24 h 后移除, 叶碟上留下的卵可直接收集或再生长发育 1、2 和 3 d 后收集, 分别收集 1 日龄卵 (1 day-old-egg, 1E)、2 日龄卵 (2 day-old-egg, 2E)、3 日龄卵 (3 day-old-egg, 3E) 和 4 日龄卵 (4 day-old-egg, 4E)。此外, 还收集了不同发育阶段的朱砂叶螨, 包括刚孵化的幼螨、第 1 和第 2 若螨以及 3 日龄的雌成螨。以约 1 500 粒卵、400 头幼螨、300 头若螨和 200 头成螨分别提取 RNA, 各发育阶段设置 3 个生物学重复。采用 Invitrogen 公司的 TRizol 试剂盒提取 RNA, 提取方法参见试剂说明书。通过紫外分光光度计 (GE Healthcare Bio-Science) 测量吸光度来评估 RNA 的质量和浓度, 并用 1% 琼脂糖凝胶电泳进一步确认 RNA 的完整性。

1.3 基因克隆与序列分析

使用 PrimeScript[®] RT 试剂盒 (TaKaRa, 上海, 中国) 从 1 μg 总 RNA 中反转录合成第一链 cDNA。PCR 引物根据朱砂叶螨转录组数据 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/search/all/?term=SRP060716>) 设计 (表 1), 用于扩增目标基因的全长编码序列 (CDS)。PCR 扩增参照 I-5[™]2 × High-Fidelity Master Mix (北京擎科生物科技股份有限公司, 北京, 中国) 试剂盒。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳验证后, 用通用 DNA 纯化试剂盒 (天根生化科技 (北京) 有限公司, 北京, 中国) 回收纯化, 并与 pGEM-T Easy (Promega, Madison, WI) 克隆载体连接。重组质粒经核苷酸测序后, 用邻接法将目标基因序列生成相应的节肢动物蛋白进化树 (Tamura *et al.*, 2007)。使用 NCBI 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) 分析目标基因的保守结构域。

1.4 qPCR 分析

使用 DNase I (Promega, Madison, WI) 去除总 RNA 样品中的基因组 DNA 后转录 DNA 样品。使用 1.5.4.1 提取的 RNA 产物和 Prime

Script[™] RT Reagent Kit (DRR037) 进行反转录, 合成第一链 cDNA, 反应体系及程序如下: 试剂 Reagent 用量: 5 × PrimeScript Buffer 4 μL、PrimeScript RT Enzyme MIX I 1 μL、Oligo dT Primer I 1 μL、Random 6 mers 1 μL、去除 gDNA 的 RNA 11 μL、RNase-Free H₂O 2 μL、轻微混匀, 于 37 °C 孵育 15 min, 85 °C 孵育 15 s, 产物 -20 °C 保存。随后, 将模板 cDNA、qPCR Mix (Promega, Madison, WI) 和引物 (表 1) 共同添加至 qPCR 反应体系中进行 PCR 扩增 (94 °C 预变性 20 s; 10 s, 60 °C 20 s, 40 个循环; 溶解曲线 60 °C 至 95 °C, 平衡时间 15 s)。为确保扩增产物的特异性, 反应结束后对所有反应进行熔解曲线分析 (60-95 °C)。每个 qPCR 分析包括 3 个生物学重复和 2 个技术重复。选用核糖体蛋白 S18 (RP18S) 作为参考基因, 并计算相对表达量 (Pfaffl, 2001)。基因表达量的数理统计采用 SPSS16.0 软件。

1.5 RNA 干扰

通过 PCR 扩增带有 T7 启动子序列的 RNAi 靶基因的特定片段, 利用 Transcript Aid T7 High Yield Transcription Kit (赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司, 上海, 中国) 进行体外合成 dsRNA 并纯化。在螨不同发育阶段 (幼螨、若螨和成螨) 的 RNAi 试验中, 参考 Kwon 等 (2013) 方法, 将新鲜豇豆叶剪成 2 cm × 2 cm 正方形, 60 °C 下脱水 1-2 min, 将叶片放在 dsRNA 滴液 (20 μL, 约 1 200 ng/μL) 上, 直至完全吸收。每 24 h 更换一次 dsRNA 处理过的豇豆叶片。雌成螨经 dsRNA 处理 48 h 后提取 RNA, 通过 qPCR 检测沉默效率, 并在幼螨到成螨的发育过程中持续饲喂 dsRNA, 观察表型变化。以 dsGFP 作为对照, 每个处理包含 30-40 头螨, 试验重复 3 次。卵的处理中, 将 0.3 μL 的 dsRNA 滴在卵的表面, 每天处理一次, 直到孵化或死亡。使用 GFP 作为对照, 每个处理包含 30-40 头螨, 重复试验 3 次。

1.6 数据分析

使用 SPSS16.0 对试验数据进行统计分析, 两组数据之间的两两比较使用独立样本 *t* 检验

表 1 引物信息
Table 1 Primer information

引物名称 Primer name	引物序列 (5'-3') Sequence (5'-3')
cds-TcRXR2-F	ATGTACAAAAAGGATAGACCC
cds-TcRXR2-R	TTAATGGTCGGAAGTGTTTCC
dsRNA-TcRXR2-F	TAATACGACTCACTATAGGGAACTCACCAACTCCCAT
dsRNA-TcRXR2-R	TAATACGACTCACTATAGGGTATTCCGTTGTCGCTC
qPCR-TcRXR2-F	CCAAACATTTGGCAAGCAGCTG
qPCR-TcRXR2-R	GGCTTGATGTGCTGAATTACGAT
qPCR-18-S	ACGTGCTGGTGAACCTTACCGAAGA
qPCR-18-R	TGCCTATTCAAGAACCAAAGTGGG

(*t*-test), 两组以上的样本使用单因素方差分析 (ANOVA with Tukey's post hoc test), 数据之间 $P<0.05$ 则认为存在显著性差异。

2 结果与分析

2.1 RXR2 序列分析

TcRXR2 基因的完整编码序列如图 1 (A) 所示。*TcRXR2* 开放阅读框全长为 1 293 bp, 可编码 430 aa, 蛋白分子量为 48.171 5 kD, 等电点为 8.67。使用昆虫和螨的同源蛋白序列构建进化树, 如图 1 (B) 所示。RXR 在节肢动物中广泛存在, 其中, *TcRXR2* 与柑橘全爪螨 *Panonychus citri* RXR 蛋白同源性最高, 与昆虫纲的 RXR 蛋白亲缘性相对较远。RXR 蛋白隶属于类视黄醇 X 受体家族, 序列对比结果显示, *TcRXR2* 蛋白具有 DNA 结合域 (DNA-binding domain, DBD) 和配体结合域 (Ligand binding domain, LBD), 与朱砂叶螨体内同源蛋白 *TcRXR1* 相比, *TcRXR2* 缺失了 RNA 识别域 (RNA recognition motif, RRM) (图 1: C)。

2.2 *TcRXR2* 的表达特征

检测 *TcRXR2* 在朱砂叶螨发育过程中的表达量发现, *TcRXR2* 在卵期的后期 (3-4 日龄) 表达量逐渐升高, 在卵孵化前的 4 日龄卵中表达量最高 ($P=0.001$) (图 2)。在卵至成螨的发育过程中 (图 3), *TcRXR2* 在 2 龄若螨表达量最高 ($P=0.001$), 在成螨的表达量显著降低 ($P<$

0.05)。

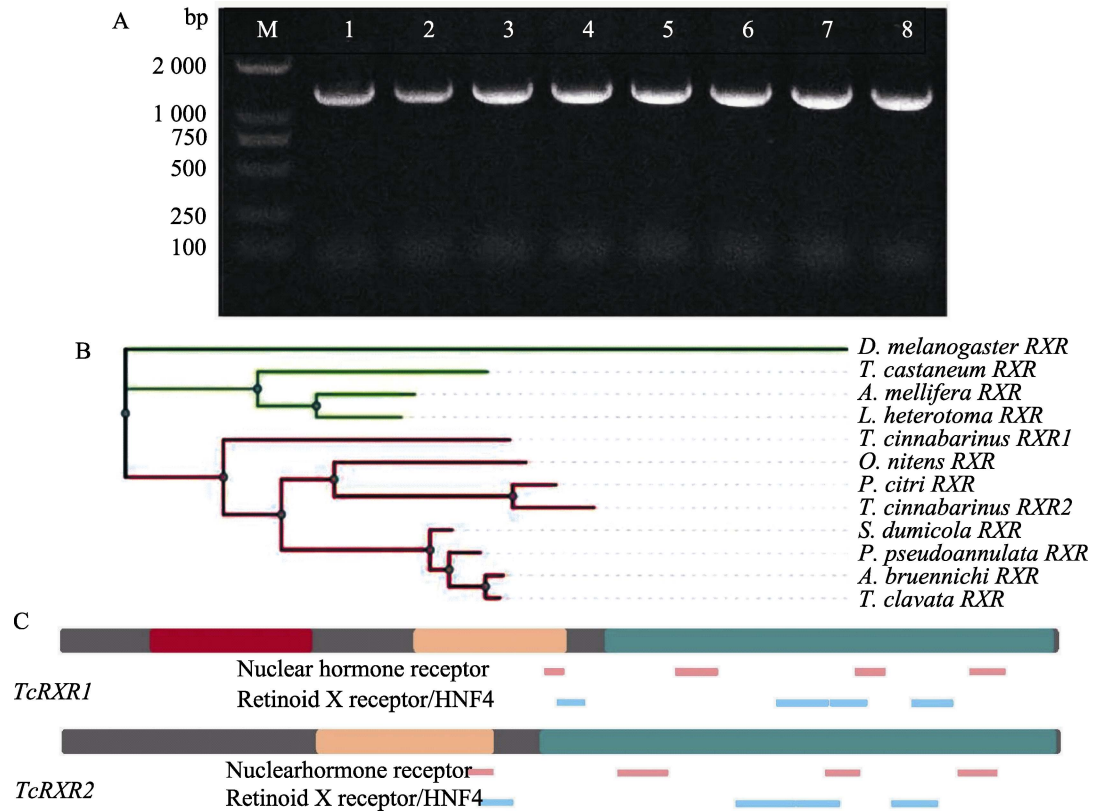
2.3 RXR2 序列的 RNA 干扰

经过饲喂法 RNAi 处理 48 h 后, 通过 qPCR 检测 *dsTcRXR2* 的干扰效率, 结果如图 4 所示, 相较于 *dsGFP* 对照组, *dsTcRXR2* 处理组的 *TcRXR2* 表达量显著下降 35% ($P=0.026$)。*dsTcRXR2* 在分子水平上的作用得到证实后, 从初孵幼螨开始进行持续饲喂 dsRNA 实验, 以评估是否可以阻断幼螨的发育, 结果显示 (图 5) 相较于 *dsGFP* 对照组, *dsTcRXR2* 处理组的幼螨存活率虽有下降, 但无显著差异 ($P>0.05$), 90% 以上的初孵幼螨均能发育至成螨。

使用 *dsTcRXR2* 对朱砂叶螨的卵进行了点滴处理, 结果如图 6 (A) 所示。相较于 *dsGFP* 对照组, *dsTcRXR2* 处理对卵具有显著的致死作用, 60% 以上的卵不能孵化 ($P=0.001$)。在表型变化中, 出现了 3 种与卵壳形态异常或脱落异常相关的致死表型, 分别为卵畸形、干瘪以及内部组织消融 (图 6: B)。

3 结论与讨论

视黄酸受体超家族基因是生物体内一种重要的转录因子, 分为两大亚家族, 其中类视黄醇 X 受体 (Retinoid X receptor, RXR) 隶属于第二亚家族核受体, 主要通过与其他核受体如甲状腺激素受体 (TR) 和类视黄醇受体 (RAR) 形成异二聚体来发挥作用, 从而识别和结合在 DNA 上的特定响应元件 (Response elements) (Brtko

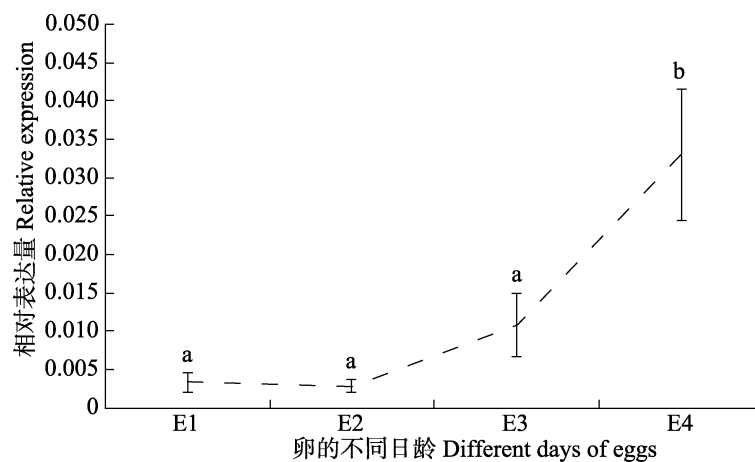
图 1 朱砂叶螨 *TcRXR2* 序列分析Fig. 1 *TcRXR2* sequence analysis of *Tetranychus cinnabarinus*

A. *TcRXR2* 全长克隆, M 代表 2 000 bp DNA marker, 1-8 代表 *TcRXR2* PCR 产物;

B. *TcRXR2* 蛋白进化树; C. *TcRXR1* 和 *TcRXR2* 蛋白结构域。

A. Full length clones of *TcRXR2*, M represents 2 000 bp DNA marker, and 1-8 represents PCR products;

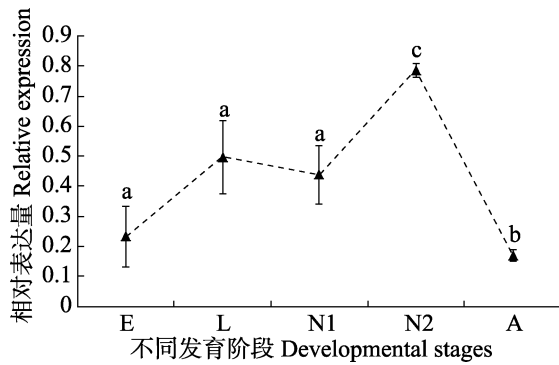
B. Phylogenetic tree of *TcRXR2* protein; C. *TcRXR1* and *TcRXR2* protein domain.

图 2 *TcRXR2* 在朱砂叶螨不同日龄卵中的表达量Fig. 2 Expression patterns of *TcRXR2* at egg developmental stages

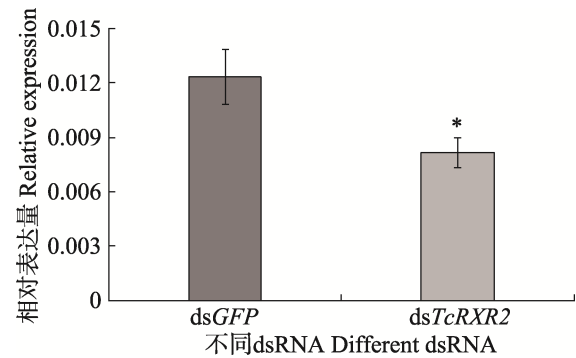
E1: 1 日龄卵; E2: 2 日龄卵; E3: 3 日龄卵; E4: 4 日龄卵。图中数值为平均值±标准误,

折线上不同小写字母代表差异显著 ($P < 0.05$, ANOVA with Tukey's post hoc test)。图 3 同。

E1: 1-day-old egg; E2: 2-day-old egg; E3: 3-day-old egg; E4: 4-day-old egg. Data are presented as mean±SE. The broken line with different letters indicates significant difference ($P < 0.05$, ANOVA with Tukey's post hoc test). The same for Fig. 3.

图 3 *TcRXR2* 在不同发育阶段的相对表达Fig. 3 Expression patterns of *TcRXR2* at different developmental stages

E: 卵; L: 幼螨; N1: 第 1 若螨;
N2: 第 2 若螨; A: 成螨。图 5 同。
E: Egg; L: Larval; N1: The first nymph;
N2: The second nymph; A: Adult.
The same for Fig. 5.

图 4 *dsTcRXR2* 干扰效率检测Fig. 4 The detection of interference efficiency of *dsTcRXR2*

图中数据为平均值±标准误, 柱上标有*表示不同处理间存在显著差异 ($P < 0.05$, t 检验)。

dsGFP: 对照组; dsTcRXR2: 处理组。下图同。

Data are presented as mean±SE. Histograms with * indicate statistical significant difference ($P < 0.05$, t -test). dsGFP: Control group; dsTcRXR2: Treatment group. The same below.

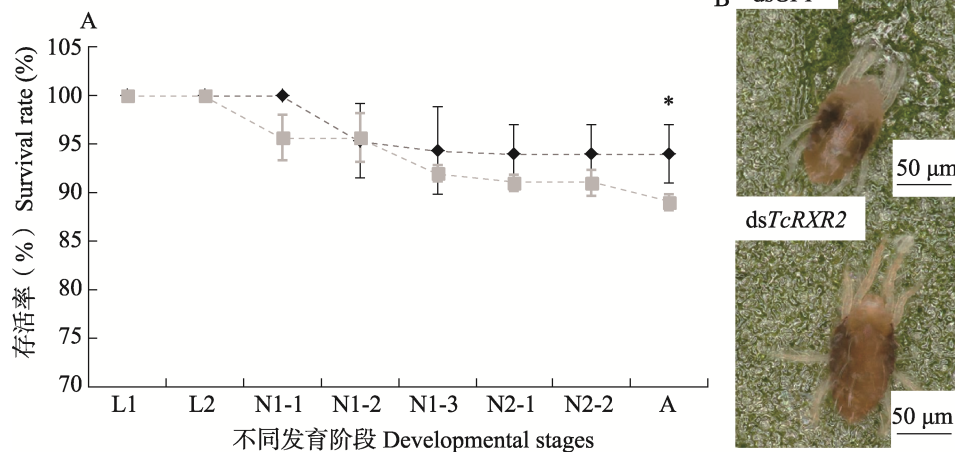


图 5 对朱砂叶螨幼螨至成螨发育的影响

Fig. 5 Effects on the development of *Tetranychus cinnabarinus* from larval to adults

A. dsRNA 对螨卵后发育的影响; B. 对应表型。L1: 幼螨第 1 天; L2: 幼螨第 2 天;

N1-1: 第 1 若螨第 1 天; N1-2: 第 1 若螨第 2 天; N1-3: 第 1 若螨第 3 天;

N2-1: 第 2 若螨第 1 天; N2-2 第 2 若螨第 2 天。

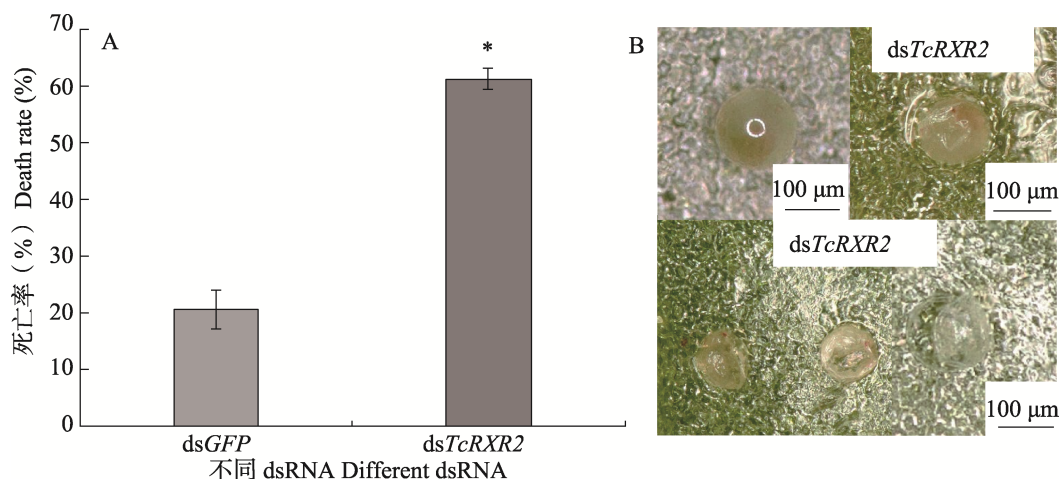
A. Effects of dsRNA on the development of mites (after egg stage); B. Corresponding phenotypes.

L1: 1st day larval; L2: 2nd day larval; N1-1: 1st day first nymph; N1-2: 2nd day first nymph;

N1-3: 3rd day first nymph; N2-1: 1st day second nymph; N2-2: 2nd day second nymph.

and Dvorak, 2020)。在昆虫中, RXR 的同源基因超气门蛋白 (USP) 作为蜕皮激素受体 (EcR) 的配体蛋白在激素通路中起着关键作用, 广泛参与昆虫的发育过程 (Bonneton *et al.*, 2003)。在烟草天蛾 *Manduca sexta*、埃及伊蚊 *Aedes aegypti* 和赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* 等多种昆虫体

内均有 2 种 USP (Jindra *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2000; Tan and Palli, 2008), 它们的功能往往与蜕皮激素受体联系密切。但是在螨类中, 虽然也发现了两条 RXR 基因, 但其功能可能与昆虫具有一定的差异。前期研究发现, 无论干扰柑橘全爪螨还是朱砂叶螨的 EcR 基因均对幼螨至成螨

图 6 *dsTcRXR2* 对卵的致死效应Fig. 6 Lethal effect of *dsTcRXR2* on the egg

A. 卵死亡率; B. 致死表型。

A. The death rate of unsuccessful hatching; B. The lethal phenotypet.

的发育过程具有致死效果, 且干扰柑橘全爪螨 *RXR* 基因可以阻断其幼螨发育至成螨 (Shen *et al.*, 2019b; Li *et al.*, 2022a), 但是在二斑叶螨的研究中发现不论干扰 *RXR1* 还是 *RXR2*, 都对幼螨至成螨的发育过程没有明显影响 (Yoon *et al.*, 2018), 这与此前朱砂叶螨 *RXR1* (Shen *et al.*, 2023) 以及本研究对 *RXR2* 的干扰结果一致。而本次研究发现利用 dsRNA 处理叶螨的 *RXR2* 基因可以显著影响卵的孵化并具有致死效应。根据前期相关报道以及本次研究的结果可以推测, *RXR2* 基因在叶螨中可能不像在其他昆虫中那样在幼螨到成螨的发育过程中发挥重要功能, 而是在卵发育过程中起到关键作用。说明在叶螨中, *RXR* 基因在卵后发育过程中的作用并不如昆虫或者柑橘全爪螨中明显。叶螨 *RXR* 与 *EcR* 是否存在互作, 以及潜在的作用机制还有待深入研究。

针对朱砂叶螨卵的 RNAi 研究发现, 水溶性物质很容易渗透进入卵内部 (Shen *et al.*, 2023), 因此一些干扰后对卵有致死效果的基因, 采用点滴法处理卵具有理想的致死效果。然而, 对于那些在卵后期起作用的基因, 由于主要通过饲喂法递送, 害螨肠道摄入的 dsRNA 容易降解, 而且难以穿透肠道到达靶标组织, 从而导致最后实验结果不如预期。因此, 本研究虽然未观察到

dsRNA 对幼螨到成螨发育过程的影响, 除了靶基因本身功能的因素外, 也有可能递送方式有关。另一方面, 在田间的应用中, 直接靶向水溶性物质更容易渗透的卵期也是更好的选择。

当前在 dsRNA 递送的方法上, 很多研究也做了突破性的尝试, 例如, 使用多种可搭载 dsRNA 的纳米材料, 这些材料可以提高 dsRNA 在生物体内的稳定性和在生物组织中的渗透性, 选择合适的递送载体可能在田间使用喷施方式应用 dsRNA 时起到至关重要的作用。目前已报道的可以成功搭载 dsRNA 的材料主要有壳聚糖 (Chitosan)、脂质体 (Lipofectamine)、碳量子点、星形聚阳离子 (Star polycation, SPc) 和肽 (Peptide) 等载体。以壳聚糖搭载 dsRNA 对埃及伊蚊进行干扰相较于直接使用 dsRNA, 可提高 5% 的致死率 (Ramesh Kumar *et al.*, 2016), 若将壳聚糖与三聚磷酸钠交联形成复合物, 可进一步提高 dsRNA 的干扰效率, 增加约 10%, 埃及伊蚊整体死亡率可达 70% 以上 (Raja *et al.*, 2015; Dhandapani *et al.*, 2019)。这是因为壳聚糖能与内吞通路的核心蛋白网格蛋白重链结合, 增加 dsRNA 被细胞内吞的量, 提高致死效率 (Zhou *et al.*, 2023)。此外, 据报道, 当碳量子点、壳聚糖和脂质体分别作为载体搭载相同 dsRNA 时, 以碳量子点为载体的 dsRNA 制剂导致二化

螟 *Chilo suppressalis* 的死亡率最高,壳聚糖次之,而脂质体最低 (Wang *et al.*, 2020)。多肽类载体同样通过提高细胞对 dsRNA 的吸收来增加昆虫的死亡率,已有报道表明多肽类载体可提高 dsRNA 对赤拟谷盗和豌豆蚜 *Acyrtosiphon pisum* 的致死率 (Avila *et al.*, 2018; Hunter *et al.*, 2018)。星形聚阳离子作为载体能够提高 dsRNA 穿透昆虫体壁的能力,进而增加致死率。据报道,相关载体能显著增加蚜虫、二化螟和草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda* 等害虫的死亡率 (Sun *et al.*, 2020; Li *et al.*, 2022b; Yan *et al.*, 2022; Chao *et al.*, 2023)。这些不同的载体主要针对 dsRNA 已被降解和难以到达靶标位置等局限,提高 dsRNA 进入靶标生物细胞的效率,从而增加其对有害生物的防控能力 (Yoon *et al.*, 2017; Vermeulen *et al.*, 2018; Demirer *et al.*, 2019)。

昆虫的卵具有独特的外壳结构,可以帮助昆虫抵御外部环境压力,以便昆虫在不利的季节或环境中保持种群的延续。相对于昆虫其他发育阶段,该阶段仅能通过渗透或者注射递送 dsRNA。如果考虑利用 dsRNA 进行害虫控制,那么目前唯一可行的递送方式就是通过渗透。考虑到这一点,我们在试验中采用的点滴法 RNAi 更接近于在大田环境中使用 dsRNA 农药的喷雾方式。

通过利用点滴法使用 dsRNA 干扰朱砂叶螨卵中 *TcRXR2* 基因,结果显示卵出现显著的致死效果。这一发现为深入研究 *TcRXR2* 基因在昆虫卵中的生物学功能提供了理论基础,也为利用 dsRNA 作为生物源农药防治朱砂叶螨奠定了基础。进一步结合已报道的 dsRNA 递送载体,探索不同的递送载体对 RNA 干扰法防治害虫的影响将成为未来研究的重要方向。

参考文献 (References)

- Auger P, Migeon A, Ueckermann EA, Tiedt L, Navajas M, 2013. Evidence for synonymy between *Tetranychus urticae* and *Tetranychus cinnabarinus* (Acari, Prostigmata, Tetranychidae): Review and new data. *Acarologia*, 53(4): 383–415.
- Avila LA, Chandrasekar R, Wilkinson KE, Balthazor J, Heerman M, Bechard J, Brown S, Park Y, Dhar S, Reeck GR, Tomich JM, 2018. Delivery of lethal dsRNAs in insect diets by branched amphiphilic peptide capsules. *Journal of Control Release*, 273: 139–146.
- Bonneton F, Zelus D, Iwema T, Robinson-rechavi M, Laudet V, 2003. Rapid divergence of the ecdysone receptor in Diptera and Lepidoptera suggests coevolution between ECR and USP-RXR. *Molecular Biology Evolution*, 20(4): 541–553.
- Brtko J, Dvorak Z, 2020. Natural and synthetic retinoid X receptor ligands and their role in selected nuclear receptor action. *Biochimie*, 179: 157–168.
- Chao ZJ, Ma ZZ, Zhang YH, Yan S, Shen J, 2023. Establishment of star polycation-based RNA interference system in all developmental stages of fall armyworm *Spodoptera frugiperda*. *Entomologia Generalis*, 43(1): 127–137.
- Choudhary C, Meghwanshi KK, Shukla N, Shukla JN, 2021. Innate and adaptive resistance to RNAi: A major challenge and hurdle to the development of double stranded RNA-based pesticides. *3 Biotech*, 11(12): 498.
- Dai YT, Zhang YJ, Wu QJ, Xie W, Wang SL, 2013. Short-term induction of host plant sensitivity and detoxification enzyme activity of the *Tetranychus urticae*. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 50(2): 382–387. [戴宇婷, 张友军, 吴青君, 谢文, 王少丽, 2013. 寄主植物对朱砂叶螨药剂敏感性 & 解毒酶活性的短期诱导研究. *应用昆虫学报*, 50(2): 382–387.]
- Demirer GS, Zhang H, Matos JL, Goh NS, Cunningham FJ, Sung Y, Chang R, Aditham AJ, Chio L, Cho MJ, Staskawicz B, Landry MP, 2019. High aspect ratio nanomaterials enable delivery of functional genetic material without DNA integration in mature plants. *Nature Nanotechnology*, 14(5): 456–464.
- Dhandapani RK, Gurusamy D, Howell JL, Palli SR, 2019. Development of CS-TPP-dsRNA nanoparticles to enhance RNAi efficiency in the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Scientific Reports*, 9(1): 8775.
- Fire A, Xu S, 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.
- Grbić M, Van Leeuwen T, Clark RM, Rombauts S, Rouzé P, Grbić V, Osborne EJ, Dermauw W, Ngoc PCT, Ortego F, Hernández-crespo P, Diaz I, Martinez M, Navajas M, Sucena É, Magalhães S, Nagy L, Pace RM, Djuranovic S, Smagghe G, Iga M, Christiaens O, Veenstra JA, Ewer J, Villalobos RM, Hutter JL, Hudson SD, Velez M, Yi SV, Zeng J, Pires-dasilva a, Roch F, Cazaux M, Navarro M, Zhurov V, Acevedo G, Bjelica A, Fawcett JA, Bonnet E, Martens C, Baele G, Wissler L, Sanchez-rodriguez A, Tirry L, Blais C, Demeestere K, Henz SR, Gregory TR, Mathieu J, Verdon L, Farinelli L, Schmutz J, Lindquist E,

- Feyereisen R, Van de Peer Y, 2011. The genome of *Tetranychus urticae* reveals herbivorous pest adaptations. *Nature*, 479(7374): 487–492.
- Head GP, Carroll MW, Evans SP, Rule DM, Willse AR, Clark TL, Storer NP, Flannagan RD, Samuel LW, Meinke LJ, 2017. Evaluation of martStax and SmartStax PRO maize against western corn rootworm and northern corn rootworm: Efficacy and resistance management. *Pest Management Science*, 73(9): 1883–1899.
- He L, Xue CH, Wang JJ, Li M, Lu WC, Zhao ZM, 2008. Resistance selection and biochemical mechanism of resistance to two Acaricides in *Tetranychus cinnabarinus* (Boiduval). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 93(1): 47–52.
- Hough J, Howard JD, Brown S, Portwood DE, Kilby PM, Dickman MJ, 2022. Strategies for the production of dsRNA biocontrols as alternatives to chemical pesticides. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 10: 980592.
- Hunter W, González MT, Tomich J, 2018. BAPC-assisted CRISPR/Cas9 system: Targeted delivery into adult ovaries for heritable germline gene editing (Arthropoda: Hemiptera). *bioRxiv*, 478743.
- Jain RG, Robinson KE, Fletcher SJ, Mitter N, 2020. RNAi-based functional genomics in Hemiptera. *Insects*, 11(9): 557.
- Jiang S, Wu H, Liu HJ, Zheng J, Lin YJ, Chen H, 2017. The overexpression of insect endogenous small RNAs in transgenic rice inhibits growth and delays pupation of striped stem borer (*Chilo suppressalis*). *Pest Management Science*, 73(7): 1453–1461.
- Jindra M, Huang JY, Malone F, Asahina M, Riddiford LM, 1997. Identification and mRNA developmental profiles of two ultraspiracle isoforms in the epidermis and wings of *Manduca sexta*. *Insect Molecular Biology*, 6(1): 41–53.
- Kumar M, Gupta GP, Rajam MV, 2008. Silencing of acetylcholinesterase gene of *Helicoverpa armigera* by siRNA affects larval growth and its life cycle. *Journal of Insect Physiology*, 55(3): 273–278.
- Kwon DH, Park JH, Ashok PA, Lee U, Lee SH, 2016. Screening of target genes for RNAi in *Tetranychus urticae* and RNAi toxicity enhancement by chimeric genes. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 130: 1–7.
- Kwon DH, Park JH, Lee SH, 2013. Screening of lethal genes for feeding RNAi by leaf disc-mediated systematic delivery of dsRNA in *Tetranychus urticae*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 105(1): 69–75.
- Li G, Liu XY, Smagghe G, Niu JZ, Wang JJ, 2022a. Molting process revealed by the detailed expression profiles of RXR1/RXR2 and mining the associated genes in a spider mite, *Panonychus citri*. *Insect Science*, 29(2): 430–442.
- Li MS, Ma ZZ, Peng M, Li L, Yin MZ, Yan S, Shen J, 2022b. A gene and drug co-delivery application helps to solve the short life disadvantage of RNA drug. *Nano Today*, 43: 101452.
- Liao Y, Tang LL, 2016. Inducible RNAi system and its application in novel therapeutics. *Critical Reviews in Biotechnology*, 36(4): 630–638.
- Migeon A, Nouguié E, Dorkeld F, 2010. Spider mites web: A comprehensive database for the Tetranychidae. Trends in Acarology: Proceedings of the 12th International Congress. Springer Netherlands, Dordrecht: 557–560.
- Niu JZ, Shen GM, Christiaens O, Smagghe G, He L, Wang JJ, 2018. Beyond insects: Current status and achievements of RNA interference in mite pests and future perspectives. *Pest Management Science*, 74(12): 2680–2687.
- Ouyang JQ, Tian YJ, Jiang CX, Yang QF, Wang HJ, Li Q, 2018. Laboratory assays on the effects of a novel acaricide, SYP-9625 on *Tetranychus cinnabarinus* (Boisduval) and its natural enemy, *Neoseiulus californicus* (McGregor). *PLoS ONE*, 13(11): e0199269.
- Pfaffl MW, 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29(9): e45.
- Powell ME, Bradish HM, Gatehouse JA, Fitches EC, 2017. Systemic RNAi in the small hive beetle *Aethina tumida* Murray (Coleoptera: Nitidulidae), a serious pest of the European honey bee *Apis mellifera*. *Pest Management Science*, 73(1): 53–63.
- Qu MB, Guo XX, Kong L, Hou LJ, Yang Q, 2022. A midgut-specific lytic polysaccharide monooxygenase of *Locusta migratoria* is indispensable for the deconstruction of the peritrophic matrix. *Insect Science*, 29(5): 1287–1298.
- Raja MAG, Katas H, Wen TJ, 2015. Stability, intracellular delivery, and release of siRNA from chitosan nanoparticles using different cross-linkers. *PLoS ONE*, 10(6): e0128963.
- Ramesh Kumar D, Saravana Kumar P, Gandhi MR, Al-Dhabi NA, Paulraj MG, Ignacimuthu S, 2016. Delivery of chitosan/dsRNA nanoparticles for silencing of wing development vestigial (vg) gene in *Aedes aegypti* mosquitoes. *International Journal of Biological Macromolecules*, 86: 89–95.
- Rodrigues TB, Mishra SK, Sridharan K, Barnes ER, Alyokhin A, Tuttle R, Kokulapalan W, Garby D, Skizim NJ, Tang YW, Manley B, Aulisa L, Flannagan RD, Cobb C, Narva KE, 2021. First sprayable double-stranded RNA-based biopesticide product targets *Proteasome* subunit beta type-5 in colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata*). *Frontiers in Plant Science*, 12:

- 728652.
- Saw PE, Song EW, 2020. siRNA therapeutics: A clinical reality. *Science China-Life Sciences*, 63: 485–500.
- Sertkaya E, Kaya K, Soylu S, 2010. Acaricidal activities of the essential oils from several medicinal plants against the carmine spider mite (*Tetranychus cinnabarinus* Boisd.) (Acarina: Tetranychidae). *Industrial Crops and Products*, 31(1): 107–112.
- Shen GM, Chen W, Li CZ, Ou SY, He L, 2019. RNAi targeting ecdysone receptor blocks the larva to adult development of *Tetranychus cinnabarinus*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 159: 85–90.
- Shen GM, Ma T, Chen XR, Chen L, Liu GM, Luo YJ, Adang M, He L, 2023. Retinoid X receptor 1 is a specific lethal RNAi target disturbing chitin metabolism during hatching of *Tetranychus cinnabarinus*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 245: 125458.
- Stumpf N, Nauen R, 2001. Cross-resistance, inheritance, and biochemistry of mitochondrial electron transport inhibitor-acaricide resistance in *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). *Journal of Economic Entomology*, 94(6): 1577–1583.
- Sun YJ, Wang PP, Abouzaid M, Zhou H, Liu H, Yang P, Lin YJ, Hull JJ, Ma WH, 2020. Nanomaterial-wrapped dsCYP15C1, a potential RNAi-based strategy for pest control against *Chilo suppressalis*. *Pest Management Science*, 76(7): 2483–2489.
- Sun YW, Sparks C, Jones H, Riley M, Francis F, Du WM, Xia LQ, 2019. Silencing an essential gene involved in infestation and digestion in grain aphid through plant-mediated RNA interference generates aphid-resistant wheat plants. *Plant Biotechnology Journal*, 17(5): 852–854.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S, 2007. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 24(8): 1596–1599.
- Tan AJ, Palli SR, 2008. Ecdysone receptor isoforms play distinct roles in controlling molting and metamorphosis in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 291(1/2): 42–49.
- Van Leeuwen T, Vontas J, Tsagkarakou A, Dermauw W, Tirry L, 2010. Acaricide resistance mechanisms in the two-spotted spider mite *Tetranychus urticae* and other important Acari: A review. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 40(8): 563–572.
- Vermeulen LMP, Brans T, Samal SK, Dubruel P, Demeester J, De SSC, Remaut K, Braeckmans K, 2018. Endosomal size and membrane leakiness influence proton sponge-based rupture of endosomal vesicles. *ACS Nano*, 12(3): 2332–2345.
- Wang BJ, Hu YP, Shin GM, Liu H, 2019. Field resistance monitoring of *Tetranychus urticae* and analysis of its resistance mechanism in Tongnan, Chongqing. *Plant Protection*, 45(1): 88–92, 97. [王保军, 胡云鹏, 申光茂, 刘怀, 2019. 重庆潼南朱砂叶螨田间抗性监测及其抗性机制分析. 植物保护, 45(1): 88–92, 97.]
- Wang KX, Peng YC, Chen JS, Peng Y, Wang XS, Shen ZH, Han ZJ, 2020. Comparison of efficacy of RNAi mediated by various nanoparticles in the rice striped stem borer (*Chilo suppressalis*). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 165: 104467.
- Wang SF, Li C, Zhu J, Miura K, Miksicek RJ, Raikhel AS, 2000. Differential expression and regulation by 20-hydroxyecdysone of mosquito ultraspiracle isoforms. *Developmental Biology*, 218(1): 99–113.
- Xu KK, Yan Y, Yan SY, Xia PL, Yang WJ, Li C, Yang H, 2021a. Disruption of the serine/threonine kinase *Akt* gene affects ovarian development and fecundity in the cigarette beetle, *Lasioderma serricorne*. *Frontiers in Physiology*, 12: 765819.
- Xu QY, Deng P, Mu LL, Fu KY, Guo WC, Li GQ, 2019. Silencing *Taiman* impairs larval development in *Leptinotarsa decemlineata*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 160: 30–39.
- Xu YY, Wei W, Lin GZ, Yan S, Zhang JZ, Shen J, Wang D, 2021b. The Ras/MAPK pathway is required for regenerative growth of wing discs in the black cutworm *Agrotis ypsilon*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 131: 103552.
- Yan S, Yin H, Li N, Chen Y, Ji CD, Jiang QH, Du J, Yin MZ, Shen J, Zhang JZ, 2022. Combination of a nanocarrier delivery system with genetic manipulation further improves pesticide efficiency: A case study with chlorfenapyr. *Environmental Science: Nano*, 9(6): 2020–2031.
- Yoon JS, Gurusamy D, Palli SR, 2017. Accumulation of dsRNA in endosomes contributes to inefficient RNA interference in the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 90: 53–60.
- Yoon JS, Sahoo DK, Maiti IB, Palli SR, 2018. Identification of target genes for RNAi-mediated control of the twospotted spider mite. *Scientific Reports*, 8(1): 14687.
- Zhang J, Khan SA, Heckel DG, Bock R, 2017. Next-generation insect-resistant plants: RNAi-mediated crop protection. *Trends in Biotechnology*, 35(9): 871–882.
- Zhang Y, Li Z, Wang ZL, Zhang LZ, Zeng ZJ, 2022. A comparison of RNA interference via injection and feeding in honey bees. *Insects*, 13(10): 928.
- Zhou H, Wan FL, Jian YF, Guo FY, Zhang M, Shi SY, Yang L, Li SL, Liu Y, Ding W, 2023. Chitosan/dsRNA polyplex nanoparticles advance environmental RNA interference efficiency through activating clathrin-dependent endocytosis. *International Journal of Biological Macromolecules*, 253 (Pt 4): 127021.