靶向*FPPS*基因的RNA干扰技术对农业害螨的防控效果评估

李 刚[1] 李庆艳[1] 李 卓[1] 曹璋光[1] 于洪文[1] 李忠意[2] 古欣瑶[2*]

（1. 贵州大学昆虫研究所，贵阳 550025；2. 贵州大学动物科学学院，贵阳 550025）

摘要：为明确保幼激素合成关键酶——法尼基焦磷酸合成酶（farnesyl pyrophosphate synthase，FPPS）作为害螨RNA干扰防控靶标的可行性，通过dsRNAEngineer在线平台设计*FPPS*的dsRNA（ds*FPPS*），采用注射法测定其对农业重要害螨二斑叶螨*Tetranychus urticae*和伊氏叶螨*Tetranychus evansi*的生物活性，采用实时荧光定量PCR技术检测注射ds*FPPS*后害螨体内*FPPS*的表达水平，并通过饲喂法和注射法分别评价其对非靶标生物加州新小绥螨*Neoseiulus californicus*和异色瓢虫*Harmonia axyridis*的安全性。结果显示：注射ds*FPPS*后，二斑叶螨和伊氏叶螨体内*FPPS*的表达量分别显著降低了91.80%和83.09%；两种叶螨后若螨均无法正常蜕皮而死亡，死亡率分别为76.97%和84.32%。饲喂或注射ds*FPPS*后加州新小绥螨和异色瓢虫均发育正常，证明其对天敌生物无显著影响。表明ds*FPPS*对害螨具有高效致死性且对非靶标生物安全，*FPPS*基因可作为叶螨RNA干扰防控的理想靶标，具有开发为新型绿色杀螨剂的潜力。

关键词：叶螨；RNA干扰；法尼基焦磷酸合成酶；特异性dsRNA；生物安全；防控靶标

Evaluation of the control efficacy of RNA interference targeting the *FPPS* gene against pest mites

Li Gang[1] Li Qingyan[1] Li Zhuo[1] Cao Zhangguang[1] Yu Hongwen[1] Li Zhongyi[2] Gu Xinyao[2*]

（1. Institute of Entomology, Guizhou University, Guiyang 550025, Guizhou Province, China;
2. College of Animal Science, Guizhou University, Guiyang 550025, Guizhou Province, China）

Abstract: To assess the feasibility of farnesyl pyrophosphate synthase (FPPS), a key enzyme in juvenile hormone biosynthesis, as a target for RNA interference (RNAi)-based control of pest mites, double-stranded RNA targeting FPPS (ds*FPPS*) was designed using the dsRNAEngineer online platform. The bioactivity of ds*FPPS* against two agriculturally important pest mites, *Tetranychus urticae* and *Tetranychus evansi*, was evaluated with microinjection. The expression levels of *FPPS* in mites after ds*FPPS* injection were determined by quantitative real-time PCR, and the safety to non-target organisms, *Neoseiulus californicus* and *Harmonia axyridis*, was assessed by feeding and microinjection assays. The results showed that after ds*FPPS* injection, *FPPS* transcript levels in *T. urticae* and *T. evansi* were significantly reduced by 91.80% and 83.09%, respectively. Deutonymphs of both mite species failed to molt normally and died, with mortality rates of 76.97% and 84.32%, respectively. After feeding on or microinjection ds*FPPS*, *N. californicus* and *H. axyridis* developed normally, indicating no significant effects on these natural enemies. These findings demonstrate that ds*FPPS* has high lethality against pest mites while being safe for non-target organisms. The *FPPS* gene can therefore serve as an ideal target

基金项目：贵州省科学技术协会青年科技人才托举工程项目（GASTYESS202411）

* 通信作者（Author for correspondence），E-mail：guxy@gzu.edu.cn

收稿日期：2025-07-16

for RNAi-based control of pest mites and has potential for development as a novel environmentally friendly acaricide.

Key words: spider mites; RNA interference; farnesyl pyrophosphate synthetase; specific dsRNA; biosafety; control target

叶螨是重要的世界性经济害螨，寄主范围广，可取食为害蔬菜、果树和花卉等3 800多种寄主植物，在全球范围内造成了巨大的经济损失（Migeon et al.，2010；常芸等，2020）。化学防治是叶螨田间防控的主要手段，而频繁使用化学药剂导致叶螨抗药性问题十分突出（徐丹丹等，2018；王帅宇等，2023；董瑞等，2024）。农业重要害螨二斑叶螨 *Tetranychus urticae* 的田间抗药性监测结果显示，其对杀螨剂甲氰菊酯、溴虫腈以及阿维菌素的抗性倍数分别高达280.51倍、952.00倍和1 000.00倍以上（沈慧敏和杨宝生 2001；徐丹丹，2019；田甜等，2023）；据节肢动物抗药性数据库统计，二斑叶螨已经成为世界上抗药性最严重的节肢动物之一。因此，发掘叶螨防控新靶标，开发特异性绿色防控技术体系，对叶螨田间抗药性治理有着重要的科学意义。RNA干扰（RNA interference，RNAi）技术通过引入外源dsRNA对靶标基因mRNA实现转录后沉默，从而出现表型缺陷或功能丧失。目前，利用RNAi技术抑制害虫生长发育和侵染为害的关键基因表达，可以阻碍其正常的生长、发育和繁殖，甚至导致死亡，具有低剂量、高防效和可持续的特点（Zhu & Palli，2020；Silver et al.，2021；Wang et al.，2024），已广泛用于马铃薯甲虫 *Leptinotarsa decemlineata*、玉米根甲虫 *Diabrotica virgifera* 和黄曲条跳甲 *Phyllotreta striolata* 等农业害虫的防控（Zotti et al.，2018；Yan et al.，2021）。因此，利用RNAi技术抑制叶螨生长发育过程关键基因表达，阻断其生长发育过程，可作为叶螨绿色防控技术开发新方向。

昆虫生长发育过程受到多种激素的相互协调作用，保幼激素（juvenile hormone，JH）作为昆虫生长发育过程的重要调控激素，决定了昆虫生长发育过程的形态和生理特征。JH的合成受到一系列合成酶的催化，法尼基焦磷酸合成酶（farnesyl pyrophosphate synthetase，FPPS）作为JH合成通路的关键酶之一，属于异戊二烯转移酶E家族中的碳链延伸酶，能够催化甲羟戊酸途径的最终反应，生成JH的前体法尼基焦磷酸（Dhar et al.，2013）。在昆虫体内，FPPS参与调控生长发育和蜕皮过程。例如在棉蚜 *Aphis gossypii* 中，利用RNAi技术抑制其3龄幼虫 *FPPS* 的表达后，蜕皮后的雌蚜体型明显变小，繁殖力显著下降（Sun & Li，2018）；在家蚕 *Bombyx mori* 中，敲低 *BmFPPS* 会使JH滴度降低，导致幼虫出现性早熟现象（Fang et al.，2024）；在棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 中，敲低 *HaFpps4* 导致JH滴度降低，不仅对JH通路中其他基因的转录水平产生负面影响，还会使幼虫蜕皮受阻，最终死亡（Zhang et al.，2017）。在二斑叶螨中，利用RNAi技术抑制 *TuFPPS* 表达后，若螨出现发育延迟和蜕皮异常致死的现象（Li et al.，2025），表明FPPS在二斑叶螨变态发育过程发挥着重要作用。然而，*FPPS* 是否可作为叶螨RNAi防控靶标尚不明晰。

本研究利用dsRNAEngineer在线平台（https://dsrna-engineer.cn）（Chen et al.，2025），根据二斑叶螨 *FPPS* 基因mRNA序列设计dsRNA（ds*FPPS*）片段，选用二斑叶螨和伊氏叶螨 *Tetranychus evansi* 进行RNAi试验，以评估ds*FPPS*对两种叶螨的防控效果；同时，对加州新小绥螨 *Neoseiulus californicus* 和异色瓢虫 *Harmonia axyridis* 进行RNAi试验，以评估ds*FPPS*对非靶标生物的安全性，探究 *FPPS* 作为叶螨RNAi防控靶标的潜力，以期为叶螨的新型绿色防控策略提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试螨类和昆虫：二斑叶螨和伊氏叶螨均为贵州大学昆虫研究所保存品系，在室内分别以菜豆 *Phaseolus vulgaris*（品种为紫花芸豆）和番茄 *Solanum lycopersicum*（品种为中蔬4号）叶片饲养（Wang et al.，2023），取后若螨供试。加州新小绥螨购买于福州冠农生物科技有限公司，用二斑叶螨、伊氏叶螨和加州新小绥螨于温度（27±1）℃、光照周期14 L∶10 D、相对湿度（65±5）%条件下饲养，取后若螨供试。异色瓢虫购买于河南省济源白云实业有限公司，用人工饲料（Sun et al.，2018）饲养，饲养温度和相对湿度同上，光照周期为10 L∶14 D，取4龄幼虫供试。

供试植物：紫花芸豆和中蔬4号番茄种子分别购自可米庄园商贸和金种子农资公司，在温度（27±1）℃、

光照周期14 L∶10 D、相对湿度(65±5)%条件下培养至幼苗期后,用于饲喂二斑叶螨和伊氏叶螨。

试剂:总RNA提取试剂(TRIzol),生工生物工程(上海)股份有限公司;胶回收试剂盒、dsRNA合成试剂盒,美国赛默飞世尔科技;cDNA反转录试剂盒、2×*Taq* PCR StarMix with Loading Dye、RealStar Green Fast Mixture试剂盒,北京康润诚业生物科技有限公司;其余试剂均为国产分析纯。

仪器:CFX96™荧光定量PCR仪、C1000™ Thermal Cycler PCR仪、PowerPac Basic电泳仪,伯乐生命医学产品(上海)有限公司;Nanodrop 2000超微量分光光度计,美国赛默飞世尔科技公司;SYS-PV830气动皮升操作泵、Micro-2T微量注射泵,世界精密仪器商贸(上海)有限公司;VHX-6000超景深三维显微镜,基恩士(中国)有限公司;RXZ-260B型智能型人工气候箱,宁波东南仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 dsRNA的设计与合成

在dsRNAEngineer在线平台输入二斑叶螨*FPPS*基因(命名为*TuFPPS*)的mRNA序列,选择二斑叶螨、伊氏叶螨、朱砂叶螨*Tetranychus cinnabarinus*、柑橘全爪螨*Panonychus citri*、截形叶螨*Tetranychus truncatus*和苹果全爪螨*Panonychus ulmi*为靶标物种,选择西方静走螨*Galendromus occidentalis*、巴氏新小绥螨*Neoseiulus barkeri*、加州新小绥螨和异色瓢虫为脱靶物种,完成叶螨在靶位点和非靶标生物脱靶位点分析后,将筛选出来的脱靶序列(以捕食螨的脱靶序列为主)用SnapGene软件剪切掉,将剩下的序列拼接起来,将以上步骤重复3次,把捕食螨所有的脱靶序列剪切后得到dsRNA片段并命名为ds*FPPS*。将该dsRNA片段的5′端添加T7启动子序列(taatacgactcactataggg)后,送至生工生物工程(上海)股份有限公司合成*dsFPPS* cDNA序列。

根据ds*FPPS*核酸序列,利用NCBI在线网站(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast)设计并克隆该片段的引物(表1),本研究所有引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。以合成的ds*FPPS* cDNA序列为模板,通过特异性PCR扩增获得带有T7启动子序列的DNA片段,25 μL反应体系为:2×*Taq* PCR StarMix with Loading Dye 12.5 μL、上下游引物各1.0 μL、cDNA模板2.0 μL、DEPC-H_2O 8.5 μL。然后以合成的带有T7启动子序列的DNA片段为模板,利用dsRNA合成试剂盒按照说明书合成dsRNA并纯化。

表1 本研究所用引物信息

Table 1 Primer information used in this study

名称 Name	引物序列(5′−3′) Primer sequence (5′−3′)	用途 Purpose
ds*FPPS*	F: taatacgactcactatagggATGAACCAAAAATAAATATTGG	克隆dsRNA Cloning of dsRNA
	R: taatacgactcactatagggTTATTTACTTCGGCGGTAGA	
ds*GFP*	F: taatacgactcactatagggTGGGCACAAATTTTCTGTC	
	R: taatacgactcactatagggAAGGGTATCACCTTCAAAC	
TuFPPS	F: CTGCCCATTCGATTGGCTTT	实时荧光定量PCR Real-time quantitative PCR
	R: TCTCGGCCAATCTTTCCGAT	
TuATP	F: CCCGAAGAGATGATCCAAACTG	
	R: CGGTAAACCTGATGCTGAGAAA	
TeFPPS	F: TCTCTGACTTTGGCGACACT	
	R: GGACCCTGCTGTAATCGGAA	
TeATP	F: GTTTTCGCTGCAATGGGTGT	
	R: GTGTCGACCACATTGGTAAGC	

引物序列中小写字母所示为T7启动子序列。Lowercase letters in primer sequence indicate the T7 promoter sequence.

1.2.2 ds*FPPS*对害螨的防控效果评估

采用注射法评估ds*FPPS*对二斑叶螨和伊氏叶螨的防控效果。将1.2.1纯化后的ds*FPPS*浓度调整至10 000 ng/μL,使用气动皮升操作泵将dsRNA注射入刚蜕皮8 h以内的二斑叶螨和伊氏叶螨后若螨体内,每头螨大约注射1~2 nL的ds*FPPS*,以注射等量绿色荧光蛋白(green fluorescent protein,GFP)基因的dsRNA(ds*GFP*)为对照,制备方法同1.2.1。每个处理4个重复,每个重复至少25头螨(Wei et al.,2021;Li et al.,2024)。将注射后的二斑叶螨和伊氏叶螨

分别挑回菜豆叶和番茄叶上继续饲养，饲养条件同1.1。每12 h观察并记录螨虫生长发育情况以及蜕皮和死亡的数量，计算蜕皮率和死亡率，并用超景深三维显微镜成像系统进行拍照，直至所有螨虫完成蜕皮或者死亡。统计后若螨在不同时间点的发育情况（后若螨活动期、静止期和成螨）和死亡数量。

1.2.3 *注射ds*FPPS*后害螨体内*FPPS*的沉默效率测定*

选取二斑叶螨和伊氏叶螨刚蜕皮8 h的后若螨，分别注射10 000 ng/μL的ds*FPPS*和ds*GFP*后24 h收集样品，每头螨大约注射1~2 nL，每个处理4个生物学重复，每个重复40头后若螨。利用总RNA提取试剂（TRIzol）提取样品的总RNA，用超微量分光光度计测定RNA的浓度和质量，并用1%琼脂糖凝胶检测RNA的完整性。取检测合格的总RNA，参照cDNA反转录试剂盒说明书合成cDNA模板，于−20 ℃保存备用。根据二斑叶螨和伊氏叶螨*FPPS*基因（*TuFPPS*、*TeFPPS*）和内参基因*ATP*（*TuATP*、*TeATP*）的开放阅读框序列，利用NCBI网站设计实时荧光定量PCR引物（表1）。以分别注射ds*FPPS*和ds*GFP*后的二斑叶螨和伊氏叶螨的cDNA为模板，利用上述引物和RealStar Green Fast Mixture试剂盒进行目的基因的检测，分析二斑叶螨和伊氏叶螨体内*FPPS*的沉默效率。10 μL实时荧光定量PCR反应体系：2×RealStar Green Fast Mixture 5.0 μL、cDNA模板4.0 μL、上下游引物各0.5 μL。每个样品设置2个技术重复。采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算*FPPS*在二斑叶螨和伊氏叶螨中的相对表达量，计算*FPPS*的沉默效率。沉默效率=（对照相对表达量−处理相对表达量）/对照相对表达量×100%。

1.2.4 ds*FPPS*对非靶标生物的安全性评估

采用液滴饲喂法评估ds*FPPS*对加州新小绥螨的安全性。试验设ds*FPPS*处理组和ds*GFP*对照组，将ds*FPPS*和ds*GFP*的浓度均调整至10 000 ng/μL，分别取二者的dsRNA 7.4 μL、饱和蔗糖溶液2 μL和蓝色可食用色素染料0.06 μL制备成10 μL人工液体饲料（Zhu et al.，2024）。将刚蜕皮12 h内的加州新小绥螨后若螨挑至2 cm×2 cm的菜豆叶碟上饥饿24 h，再将存活加州新小绥螨挑至新的叶碟上；每个叶碟分别滴加10 μL上述制备好的含有ds*FPPS*或ds*GFP*的人工液体饲料。每个处理4个生物学重复，每个重复至少20头。然后将处理后的加州新小绥螨置于智能型人工气候箱中饲养12 h，饲养条件同1.1。取体色变蓝的加州新小绥螨用于后续试验，饲喂dsRNA 12 h后用二斑叶螨继续喂养，每隔12 h观察并记录一次试螨的生长发育情况以及蜕皮和死亡的数量，计算蜕皮率和死亡率，并用超景深三维显微镜成像系统进行拍照，直至所有螨虫完成蜕皮或死亡。

采用注射法评估ds*FPPS*对异色瓢虫的安全性。将ds*FPPS*和ds*GFP*的浓度均调整至10 000 ng/μL，用Micro-2T微量注射泵从刚蜕皮1 d内的异色瓢虫4龄幼虫腹部节间膜向其体内注射250 nL的ds*FPPS*或ds*GFP*，每个处理4个生物学重复，每个重复5头幼虫（Zhang et al.，2021）。注射后的异色瓢虫幼虫在直径为35 mm的培养皿中单头饲养，并提供1个浸透水的脱脂棉球补充水分，将培养皿放在智能型人工气候箱中用人工饲料继续饲养，条件同1.1。每天换一次饲料和供水棉球，观察幼虫的存活情况，记录存活数、化蛹数和羽化数，并用超景深三维显微镜成像系统进行拍照，直至所有虫体死亡或羽化为成虫为止。统计异色瓢虫4龄幼虫在不同发育时间点的蜕皮数量、死亡数量和羽化数量，计算蜕皮率、死亡率和羽化率。

1.3 数据分析

采用Excel 2021对原始数据进行统计，用SPSS 22.0软件应用独立样本*t*检验法对RNAi处理后对照组和处理组蜕皮率或羽化率进行差异显著性分析，用GraphPad Prism 8.0.1软件绘图。

2 结果与分析

2.1 ds*FPPS*的基本信息

通过dsRNAEngineer在线平台对二斑叶螨*TuFPPS*基因mRNA序列进行评估，获得长度为590 bp的ds*FPPS*。ds*FPPS*共有1 552个害螨在靶位点，97个非靶标生物脱靶位点（图1）。在害螨中，二斑叶螨有680个在靶位点，伊氏叶螨有147个在靶位点，朱砂叶螨有374个在靶位点，柑橘全爪螨有95个在靶位点，截形叶螨有187个在靶位点，苹果全爪螨有73个在靶位点。在非靶标生物中，捕食螨中的西方静走螨、巴氏新小绥螨和加州新小绥螨均未发现脱靶位点，异色瓢虫有97个脱靶位点。

2.2 注射ds*FPPS*对叶螨后若螨蜕皮过程的影响

注射*dsFPPS*后，二斑叶螨和伊氏叶螨体内*FPPS*的表达量分别显著降低了91.80%和83.09%（图2）。两种叶螨注射ds*FPPS*后均出现了后若螨因无法正常完成蜕皮而被困在旧表皮中死亡的致死表型，注射ds*FPPS*后108 h二斑叶螨和伊氏叶螨的死亡率分别为76.97%和84.32%；而注射ds*GFP*对

照的二斑叶螨和伊氏叶螨的死亡率分别为6.00%和5.76%(图3-A)。

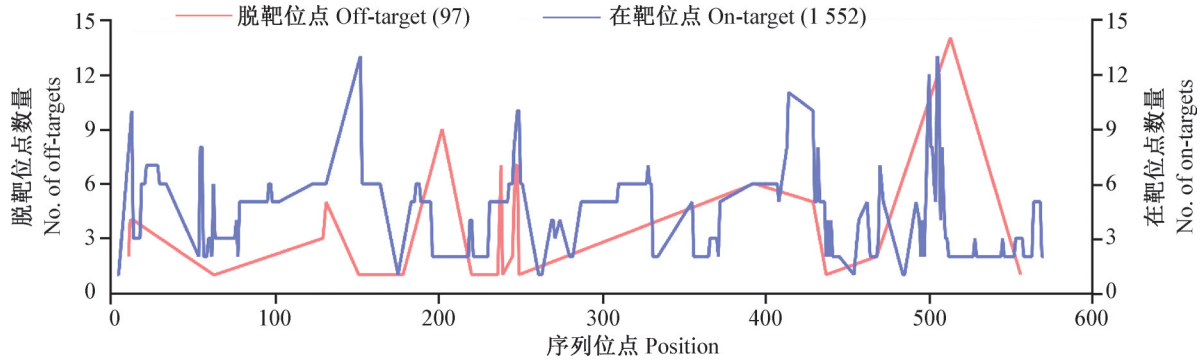


图1 *FPPS*基因序列在靶/脱靶位点分布图

Fig. 1 Distribution of on-target and off-target sites in the *FPPS* sequence

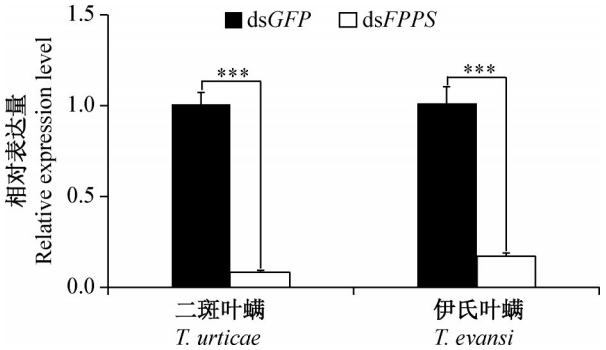


图2 注射ds*FPPS*对二斑叶螨和伊氏叶螨体内*FPPS*基因表达水平的影响

Fig. 2 Effect of ds*FPPS* injection on *FPPS* expression levels in *Tetranychus urticae* and *Tetranychus evansi*

图中数据为平均数±标准误。***表示对照与处理间经独立样本*t*检验法检验差异显著(P<0.001)。Data are mean± SE. *** indicates significant difference between the control and treatment groups based on an independent samples *t* test (P<0.001).

观察注射ds*FPPS*的二斑叶螨和伊氏叶螨后若螨的生长发育情况,注射后24 h时二斑叶螨和伊氏叶螨后若螨进入静息状态的占比分别有19.74%和16.67%,48 h时二斑叶螨和伊氏叶螨的蜕皮率分别为1.32%和3.92%,二者最终的蜕皮率分别为23.03%和15.69%;而在ds*GFP*对照组中,24 h时二斑叶螨和伊氏叶螨后若螨进入静息状态的占比分别有54.00%和18.71%,48 h时二斑叶螨和伊氏叶螨的蜕皮率分别为58.67%和4.32%,二者最终的蜕皮率分别为94.00%和94.24%(图3-B)。表明注射ds*FPPS*后,二斑叶螨和伊氏叶螨均出现不能正常蜕皮而死亡的现象。

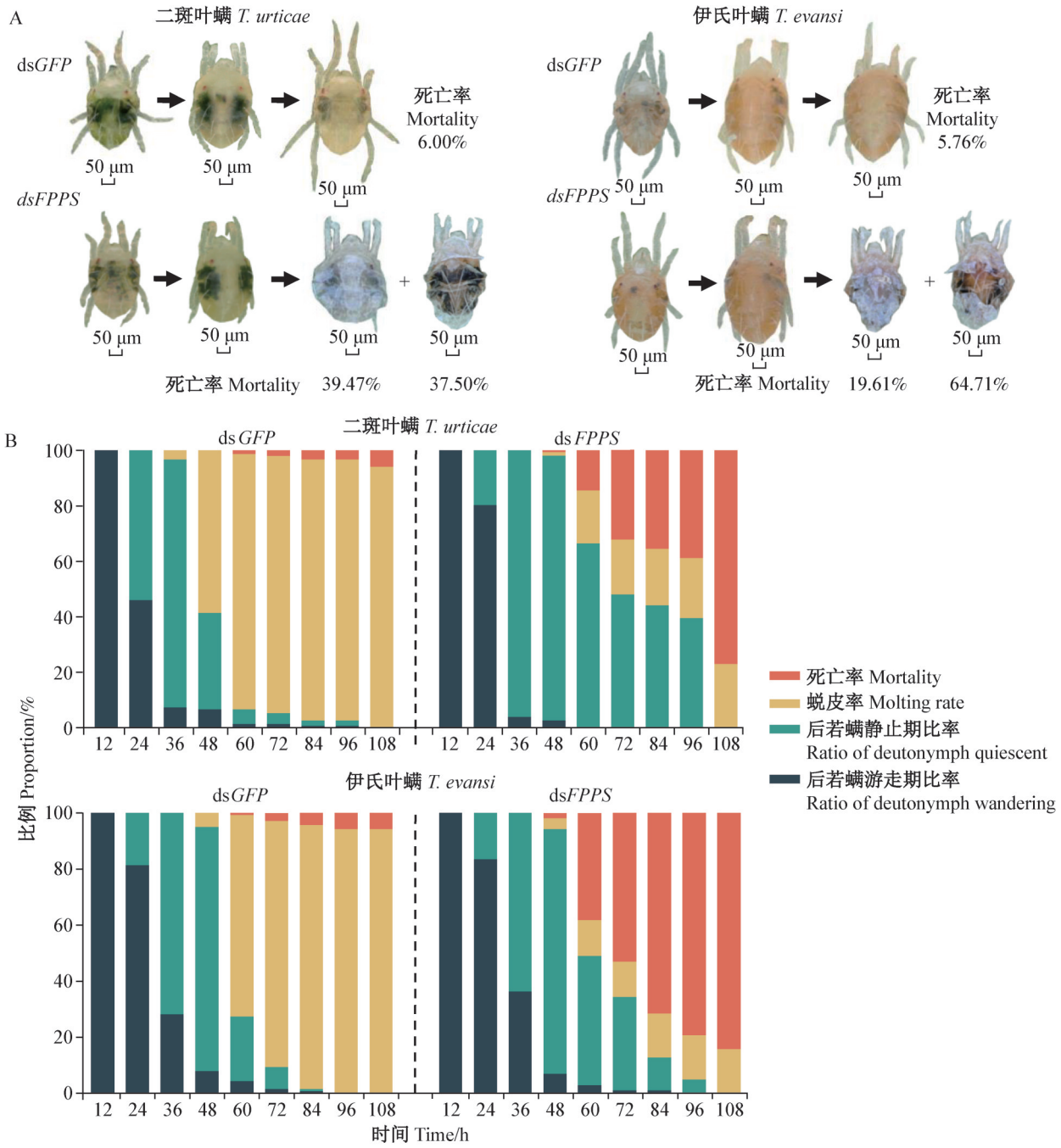
2.3 ds*FPPS*对加州新小绥螨蜕皮和异色瓢虫羽化的影响

饲喂ds*FPPS*后,加州新小绥螨后若螨能正常蜕皮发育为成螨(图4-A);注射ds*FPPS*后,异色瓢虫4龄幼虫可以正常化蛹并羽化为成虫(图4-B)。对加州新小绥螨蜕皮情况和异色瓢虫羽化情况进行统计分析,饲喂ds*FPPS*后加州新小绥螨后若螨最终的蜕皮率为96.27%,饲喂ds*GFP*的对照组最终的蜕皮率为97.56%,二者之间无显著差异,但在饲喂后48~72 h期间,ds*GFP*对照组的加州新小绥螨后若螨蜕皮率显著高于ds*FPPS*处理组,其余时间点处理组与对照组的蜕皮率均无显著差异(图4-C)。注射ds*FPPS*后异色瓢虫最终的羽化率为90.00%,注射ds*GFP*后异色瓢虫最终的羽化率为95.00%,二者之间无显著差异(图4-D)。

3 讨论

RNAi技术凭借环境安全性高、兼容性强的优势,成为一种新颖的防控技术并融入有害生物综合治理策略,符合经济、社会和农业生产对于绿色农药的需求(Zhang et al., 2013; Leggewie & Schnettler, 2018; Wang et al., 2021)。RNAi通过特异性靶向害虫物种中的关键基因,能够影响害虫的存活、发育和繁殖等生理过程(Guo et al., 2021; Lu & Shen, 2024)。基于RNAi技术的害虫防控策略在有害生物综合防控中显示出巨大的发展潜力,然而在害螨防控中则少有报道(Baum et al., 2007; Zhang et al., 2013; Leggewie & Schnettler, 2018)。前期研究发现,利用RNAi技术抑制二斑叶螨JH合成通路基因*TuFPPS*的表达,能够阻断二斑叶螨的生长发育过程,说明JH合成基因*TuFPPS*可作为防控二斑叶螨的RNAi靶标(Li et al., 2025)。因此,本研究在此基础上,利用dsRNAEngineer在线平台设计dsRNA,评估了*FPPS*基因在叶螨中高度保守的在靶位点,但

在非靶标生物中的同源性较低，以此设计了叶螨特异性dsRNA序列，从而降低了RNAi对非靶标天敌的脱靶风险。



A：注射ds*FPPS*或ds*GFP*后两种叶螨的不同表型；B：注射ds*FPPS*或ds*GFP*后两种叶螨后若螨的发育情况。

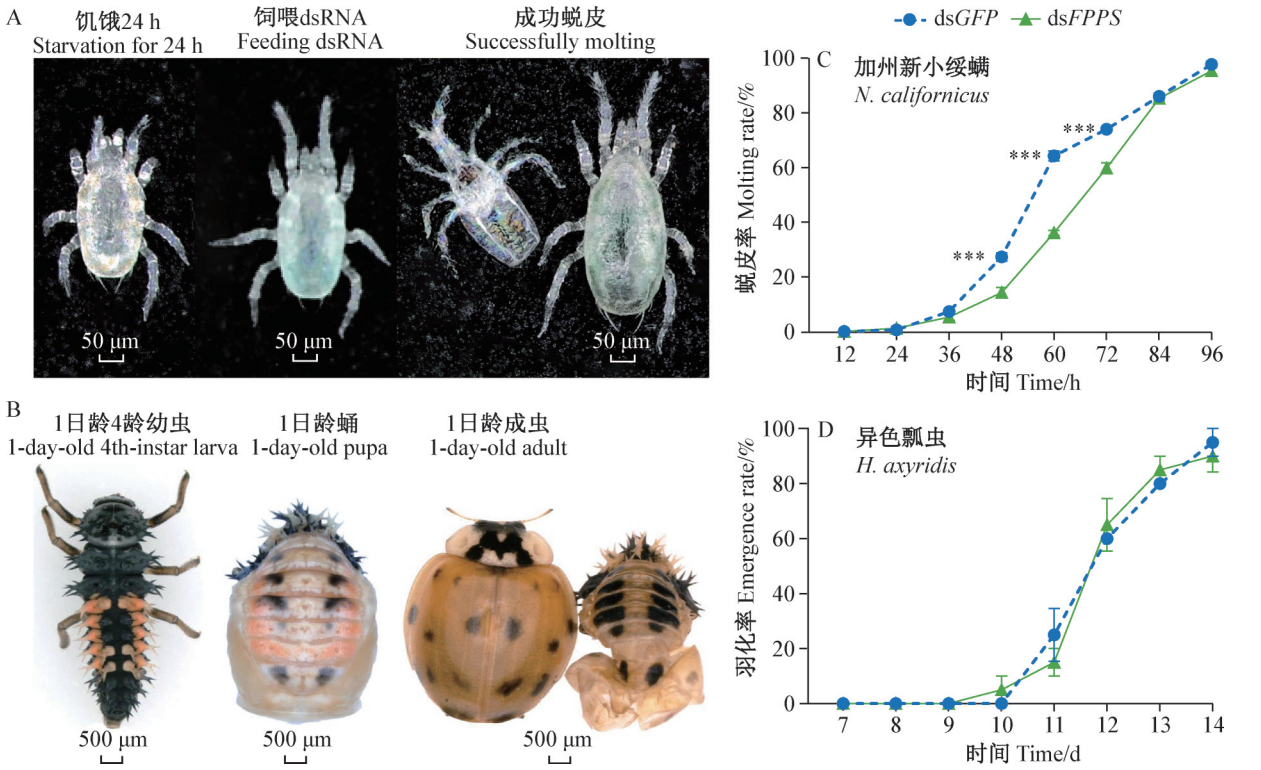
A: Phenotypic differences of mites after injection of ds*FPPS* or ds*GFP*; B: development of deutonymphs after injection of ds*FPPS* or ds*GFP*.

图3　注射ds*FPPS*对二斑叶螨和伊氏叶螨后若螨生长发育的影响

Fig. 3　Effect of ds*FPPS* injection on the development of deutonymphs of *Tetranychus urticae* and *Tetranychus evansi*

筛选高效且安全的RNAi靶标是开发绿色防控技术的基础。本研究利用RNAi技术评价了*FPPS*基因的防控效果和生物安全性，结果表明ds*FPPS*能有效抑制二斑叶螨和伊氏叶螨的生长发育过程，造成叶螨蜕皮畸形进而大量死亡，且对非靶标生物加州新小绥螨和异色瓢虫均无显著影响。另外，对叶螨基因组的分析发现，叶螨中仅存在单个*FPPS*基因，在JH合成通路中无其他功能冗余或同源基因，

这一特点使其在单基因靶向RNAi时*FPPS*基因不易被其他同功能基因或同源基因替代，能提高叶螨RNAi的稳定性。针对单基因靶向RNAi策略中普遍存在的潜在风险，如与非靶标基因部分同源导致非特异性沉默（Lundgren & Duan，2013）、长期使用可能诱导靶标基因突变（He et al.，2020），以及因基因家族功能冗余导致的RNAi效果减弱（Wu et al.，2022；Zhang et al.，2024），本研究在dsRNA设计阶段进行了针对性优化。首先，通过序列比对，去除与非靶标生物加州新小绥螨和异色瓢虫基因组同源性较高的保守片段，保留了叶螨特异性序列，从而有效降低了非特异性沉默风险。其次，*FPPS*基因在叶螨基因组中为单拷贝，且JH合成通路中无其他功能冗余基因，这一特性使其天然规避了基因代偿问题，进一步保障了RNAi的稳定性。综上，经序列优化的*FPPS*基因dsRNA兼具高效性、特异性和安全性，可作为叶螨绿色防控RNA生物农药的候选靶标。



A~B：饲喂/注射ds*FPPS*后加州新小绥螨和异色瓢虫的表型；C~D：饲喂/注射ds*FPPS*或ds*GFP*后加州新小绥螨的蜕皮率和异色瓢虫的羽化率。A–B: Phenotypes of *N. californicus* and *H. axyridis* after feeding or injection with ds*FPPS*; C–D: molting rate of *N. californicus* and emergence rate of *H. axyridis* after feeding or injection with ds*FPPS* or ds*GFP*.

图4 ds*FPPS*对加州新小绥螨蜕皮和异色瓢虫羽化的影响

Fig. 4 Effect of ds*FPPS* on molting in *Neoseiulus californicus* and emergence in *Harmonia axyridis*

图中数据为平均数±标准误。***表示对照与处理间经独立样本*t*检验法检验差异显著（$P<0.001$）。Data are mean±SE. *** indicates a significant difference between the control and treatment groups based on an independent samples *t* test ($P<0.001$).

本研究采用显微注射法作为RNAi递送方式，具有高效率和强稳定性的特点，但受限于操作复杂性，难以适用于田间规模化防控。因此，开发适用于田间环境的RNAi递送技术是提升RNAi田间防控效率的关键。目前，dsRNA常用递送方式主要包括显微注射、饲喂、喷洒、浸泡和点滴等。前期研究通过系统比较叶螨中不同递送方式的RNAi效率，发现浸泡法和叶片饲喂法是最有效的两种方式，有望成为未来田间喷雾型dsRNA产品的核心递送方案（Suzuki et al.，2017）。此外，其他递送策略也取得显著进展，例如表达细胞核/细胞质靶向dsRNA的转基因植物对朱砂叶螨具有致死效应（Wu et al.，2023）；而利用RNase缺陷型大肠杆菌*Escherichia coli* HT115菌株等微生物载体合成递送dsRNA，在试验中也表现出良好的RNAi效果（Cedeño et al.，2015）。这些递送策略也应给予更多关注。

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

Cedeño AG, Nakaya P, Niz J, Sciocco-Cap A, Salvador R. 2015. Double-stranded RNA synthesized in bacteria can be transferred to bee and *Varroa* tissues. Journal of Apicultural Research, 54(2): 99–100

Chang Y, Wang CQ, Shang SQ. 2020. Effects of sublethal concentration of bifenazate on the activities of detoxification enzymes against red spider mite *Tetranychus urticae*. Journal of Plant Protection, 47(5): 1146–1154 (in Chinese) [常芸, 王常清, 尚素琴. 2020. 联苯肼酯亚致死质量浓度对二斑叶螨 *Tetranychus urticae* 解毒酶系的影响. 植物保护学报, 47(5): 1146–1154]

Chen Y, Shi YF, Wang ZG, An X, Wei SY, Andronis C, Vontas J, Wang JJ, Niu JZ. 2025. dsRNAEngineer: a web-based tool of comprehensive dsRNA design for pest control. Trends in Biotechnology, 43(4): 969–983

Dhar MK, Koul A, Kaul S. 2013. Farnesyl pyrophosphate synthase: a key enzyme in isoprenoid biosynthetic pathway and potential molecular target for drug development. New Biotechnology, 30(2): 114–123

Dong R, Xu DD, Li YH, Wang SL. 2024. Field control efficacy of different pesticides to *Tetranychus urticae* and *T. truncatus*. China Vegetables, (1): 96–100 (in Chinese) [董瑞, 徐丹丹, 李玉焕, 王少丽. 2024. 不同药剂对二斑叶螨和截形叶螨的田间防效研究. 中国蔬菜, (1): 96–100]

Fang H, Zheng HG, Yang YY, Hu Y, Wang Z, Xia QY, Guo PC. 2024. Structural insights into the substrate binding of farnesyl diphosphate synthase FPPS1 from silkworm, *Bombyx mori*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 72(3): 1787–1796

Guo W, Guo MJ, Yang CX, Liu ZQ, Chen SM, Lü J, Qiu BL, Zhang YJ, Zhou XG, Pan HP. 2021. RNA interference-mediated silencing of vATPase subunits A and E affect survival and development of the 28-spotted ladybeetle, *Henosepilachna vigintioctopunctata*. Insect Science, 28(6): 1664–1676

He WW, Xu WB, Fu KY, Guo WC, Zhang J. 2020. Low mismatch rate between double-stranded RNA and target mRNA does not affect RNA interference efficiency in Colorado potato beetle. Insects, 11(7): 449

Leggewie M, Schnettler E. 2018. RNAi-mediated antiviral immunity in insects and their possible application. Current Opinion in Virology, 32: 108–114

Li QY, Peng QX, Li Z, Smagghe G, Li G. 2025. Knockdown of farnesyl pyrophosphate synthetase gene *TuFPPS* by RNAi extends quiescent period and halts molting of the spider mite, *Tetranychus urticae*. Experimental and Applied Acarology, 95(1): 4

Li Z, Wang L, Yi TC, Liu DD, Li G, Jin DC. 2024. The nuclear receptor gene *E75* plays a key role in regulating the molting process of the spider mite, *Tetranychus urticae*. Experimental and Applied Acarology, 92(1): 1–11

Lu J, Shen J. 2024. Target genes for RNAi in pest control: a comprehensive overview. Entomologia Generalis, 44(1): 95–114

Lundgren JG, Duan JJ. 2013. RNAi-based insecticidal crops: potential effects on nontarget species. BioScience, 63(8): 657–665

Shen HM, Yang BS. 2001. Study on the resistance of *Tetranychus urticae* Koch to 16 insecticides and acaricides. Journal of Plant Protection, 28(4): 362–366 (in Chinese) [沈慧敏, 杨宝生. 2001. 二点叶螨对16种杀虫、杀螨剂的抗药性. 植物保护学报, 28(4): 362–366]

Silver K, Cooper AM, Zhu KY. 2021. Strategies for enhancing the efficiency of RNA interference in insects. Pest Management Science, 77(6): 2645–2658

Sun YX, Hao YN, Liu TX. 2018. A β-carotene-amended artificial diet increases larval survival and be applicable in mass rearing of *Harmonia axyridis*. Biological Control, 123: 105–110

Sun ZJ, Li ZX. 2018. The terpenoid backbone biosynthesis pathway directly affects the biosynthesis of alarm pheromone in the aphid. Insect Molecular Biology, 27(6): 824–834

Suzuki T, España MU, Nunes MA, Zhurov V, Dermauw W, Osakabe M, Van Leeuwen T, Grbic M, Grbic V. 2017. Protocols for the delivery of small molecules to the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae*. PLoS ONE, 12(7): e0180658

Tian T, Zhang Y, Zhang YJ, Su Q, Wang SL. 2023. Occurrence and pesticide resistance of *Tetranychus urticae* on garlic and Chinese onion. Plant Protection, 49(4):302–308 (in Chinese) [田甜, 张妍, 张友军, 苏奇, 王少丽. 2023. 蒜和葱上二斑叶螨的发生为害及其抗药性监测. 植物保护, 49(4): 302–308]

Wang KX, Cheng H, Chen JS, Zhu GH, Tang PA, Han ZJ. 2021. Chimeric double-stranded RNAs could act as tailor-made pesticides for controlling storage insects. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 69(22): 6166–6171

Wang L, Li Z, Yi TC, Li G, Smagghe G, Jin DC. 2023. Ecdysteroid biosynthesis Halloween gene *Spook* plays an important role in the oviposition process of spider mite, *Tetranychus urticae*. International Journal of Molecular Sciences, 24(19): 14797

Wang SY, Gu ZD, Wang Y, Yang W, Jia FY, Li J, Dong J. 2023. Screening of control agents for *Tetranychus urticae* in strawberry and preliminary study on their resistance in field. China Plant Protection, 43(9): 81–83 (in Chinese) [王帅宇, 谷振东, 王胤, 杨文, 贾峰勇, 李锦, 董杰. 2023. 草莓二斑叶螨的防治药剂筛选及其田间抗药性初探. 中国植保导刊, 43(9): 81–83]

Wang ZG, Qin CY, Chen Y, Yu XY, Chen RY, Niu JZ, Wang JJ. 2024. Fusion dsRNA designs incorporating multiple target sequences

can enhance the aphid control capacity of an RNAi-based strategy. Pest Management Science, 80(6): 2689–2697

Wei P, Wang C, Li CJ, Chen M, Sun JY, Van Leeuwen T, He L. 2021. Comparing the efficiency of RNAi after feeding and injection of dsRNA in spider mites. Pesticide Biochemistry and Physiology, 179: 104966

Wu JJ, Cheng MD, Ze LJ, Shen CH, Jin L, Li GQ. 2022. Dissecting the isoform-specific roles of FTZ-F1 in the larval-larval and larval-pupal ecdyses in *Henosepilachna vigintioctopunctata*. Insects, 13(3): 228

Wu MT, Zhang Q, Dong Y, Wang ZC, Zhan WQ, Ke ZB, Li SC, He L, Ruf S, Bock R, et al. 2023. Transplastomic tomatoes expressing double-stranded RNA against a conserved gene are efficiently protected from multiple spider mites. New Phytologist, 237(4): 1363–1373

Xu DD. 2019. Monitoring of pesticide resistance and the mutation frequencies of target genes in *Tetranychus urticae*. Master thesis. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences (in Chinese) [徐丹丹. 2019. 二斑叶螨抗药性监测及靶标基因突变频率研究. 硕士学位论文. 北京: 中国农业科学院]

Xu DD, Zhang YJ, Xie W, Wu QJ, Wang SL. 2018. CAPS marker monitoring abamectin resistance in twospotted spider mite *Tetranychus urticae* Koch. Journal of Plant Protection, 45(4): 782–787 (in Chinese) [徐丹丹, 张友军, 谢文, 吴青君, 王少丽. 2018. 二斑叶螨对阿维菌素抗性的CAPS标记. 植物保护学报, 45(4): 782–787]

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

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

Zhang WN, Ma L, Xiao HJ, Liu C, Chen L, Wu SL, Liang GM. 2017. Identification and characterization of genes involving the early step of juvenile hormone pathway in *Helicoverpa armigera*. Scientific Reports, 7: 16542

Zhang Y, Feng ZJ, Chen ZS, Wang XX, Cong HS, Fan YL, Liu TX. 2021. Connection between cuticular hydrocarbons and melanization in *Harmonia axyridis* revealed by RNAi-mediated silencing of the *CYP4G79*. Entomologia Generalis, 41(1): 83–96

Zhang YC, Li HJ, Liu XM, Li HL, Lan QY, Wu HH, Wang YL, Zhang JZ, Zhao XM. 2024. Nuclear receptor FTZ-F1 controls locust molt by regulating the molting process of *Locusta migratoria*. Insects, 15(4): 237

Zhu KY, Palli SR. 2020. Mechanisms, applications, and challenges of insect RNA interference. Annual Review of Entomology, 65: 293–311

Zhu R, Yi TC, Liu RD, Jin DC. 2024. RNA interference-mediated functional analysis of vitellogenin and vitellogenin receptor in the predatory mite *Neoseiulus californicus*. Systematic and Applied Acarology, 29(3): 388–399

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 Management Science, 74(6): 1239–1250

（责任编辑：李美娟）