



Research
Green Plant Protection Innovation—Review

基于 RNA 的生物防治——一种作物保护新模式

Matthew Bramlett^{a,*}, Geert Plaetinck^a, Peter Maienfisch^{b,*}

^a Syngenta Ghent Innovation Center, Gent 9052, Belgium

^b Syngenta Crop Protection AG, Basel CH-4002, Switzerland

ARTICLE INFO

Article history:

Received 27 January 2019

Revised 29 August 2019

Accepted 20 September 2019

Available online 19 December 2019

关键词

基于RNA的生物防治

RNA干扰 (RNAi)

科罗拉多马铃薯甲虫 (CPB)

玉米根虫 (CRW)

大豆臭虫 (SSB)

摘要

现代农业企业在保障和提高食品、饲料、纤维和燃料的生产、质量和数量方面发挥着至关重要的作用。人们对化学农药对健康和环境造成影响的日益关注，促使该行业寻求替代性和更环保的方案。在过去的几年中，RNA干扰 (RNAi) 过程被认为是一种非常有前景的新方法，可作为化学和生物害虫防治剂、植物保护剂等叶面喷施、土壤或种子处理的补充。基于RNA的活性成分 (AI) 具有独特的作用方式，可以通过基因修饰 (GM) 和生物防治两种途径来实现。由于基于RNA的AI可利用自然过程来发挥控制作用，同时它们具有高度选择性，降低了非目标生物 (NTO) 的风险，因此基于RNA的AI有望提供未来作物保护剂所需要的选择性和可持续性。本文讨论了基于RNA的生物防治的替代方案在作物保护中的优势和局限性，以及RNA生物防治科罗拉多马铃薯甲虫 (CPB)、玉米根虫 (CRW) 和大豆臭虫 (SSB) 的最新研究进展。在实现各种基于RNA的产品及其广泛使用和应用的道路上，仍然存在许多挑战。尽管如此，我们仍可预期到，基于RNA的AI将成为有价值的新工具，以补充当前的农作物保护解决方案。

© 2020 THE AUTHORS. Published by Elsevier LTD on behalf of Chinese Academy of Engineering and Higher Education Press Limited Company This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

1. 引言

现代农业企业在保障和提高食品、饲料、纤维和燃料的生产、质量和数量方面发挥着至关重要的作用[1]。全球农业企业目前提供杀虫剂、除草剂、杀菌剂和生物技术产品，并在研发方面进行了大量投资，这有助于提高公众对充足供应高质量食品和农业可持续性的期望。该行业也在应对各种全球性挑战，如人口增长、热量消耗增加、全球环境压力增加、监管环境的变化以及对现有活性成分 (AI) 和性状的抗性发展。

近年来，人们日益担心化学农药对人类健康和环境

造成影响，促使该行业寻求替代解决方案，从而对生物害虫防治剂的需求增加[2–4]。2016年生物农药市场价值28.3亿美元，预计到2022年将增至66.0亿美元，在预测期内复合年增长率 (CAGR) 为15.43% [5]。

生物制品主要类别有：

- 微生物，如细菌、病毒、原生动物病毒或真菌，直接应用于植物；
- 大型生物，通常是活的有机体，如有益的昆虫和线虫；
- 信息化学物质，如信息素；
- 植物提取物。

* Corresponding author.

E-mail address: matthew.bramlett@syngenta.com (M. Bramlett), peter.maienfisch@syngenta.com (P. Maienfisch).

除此之外，最近已经确定了RNA干扰（RNAi）过程是一种非常有前景的方法，可作为化学和生物作物保护剂、植物保护剂的叶面喷雾、土壤或种子处理的补充。改良的品种、性状以及化学、生物作物保护剂的正确组合是确保未来可持续农业发展的关键。

2. RNAi 的技术背景

RNAi是一种自然机制，存在于所有真核生物（包括昆虫）中，它受序列特异性靶向的驱动，导致信使RNA（mRNA）降解[6]。通常认为RNAi是一种防御机制，可以抵抗病毒[7]以及影响基因组DNA完整性的可移动遗传因子（如转座子）。RNAi途径在许多生物体中也被用来调节蛋白质水平[8,9]。自RNAi被发现以来，它已成为实验室广泛使用的工具，用于研究基因功能[10,11]。除了用于细胞和遗传研究外，人们还强调了利用RNAi作为分子治疗剂和作物保护剂的潜力[6,12-15]。在昆虫体内，RNAi过程是由与特定mRNA互补的双链RNA（dsRNA）触发的。dsRNA可以由细胞内部合成，也可以是能被细胞吸收的外源RNA（图1）。接下来，dsRNA被一种名为DICER的核糖核酸酶切割成21~25 bp的短核苷酸片段。这些短的RNA片段即可触发mRNA降解。这些小的RNA片段被进一步整合到名为RISC（RNA诱导沉默复合体）的多蛋白复合物中，并被解离成单链。RNA双链的一条链（引导链）与具有RNase活性的蛋白质Argonaute结合，并通过同源碱

基配对与互补靶mRNA结合，Argonaute切割结合的mRNA，导致其降解。由于整个过程依赖于精确的互补序列识别，因此只有与相关小干扰RNA（siRNA）同源的mRNA受到干扰，这体现了RNAi的高选择性。在缺乏合适的mRNA的情况下，相应蛋白质的从头合成停止，最终缺少蛋白质导致生物体产生相应的功能缺陷表型。对于某些昆虫物种，通过取食dsRNA即可触发RNAi效应，使相应mRNA系统性降解，并导致相应蛋白质产物减少。在蛋白质产物对昆虫的生活力和生存至关重要的情况下，RNAi可导致昆虫的发病或死亡，这是将dsRNA用于昆虫防控和作物保护的指导原则。目标基因能否适用于昆虫防控，取决于其在重要代谢过程中的作用，以及对应蛋白质产物在表达时的临界阈值和半衰期。

3. 基于 RNA 的解决方案在农作物保护中的现状

十多年来，RNAi在农业领域中的应用潜力已经得到了广泛认可[17]。RNAi的早期应用实例包括抗木瓜病毒[18]和抗李子病毒[19]的产生，以及迟熟番茄发育[20]。如今，许多学术团体和农业综合企业，如先正达、拜耳、科迪华、巴斯夫等，正积极寻求RNAi在保护农作物免受各种昆虫侵害方面的成功应用。尽管现如今在使人们理解这种方法的潜力和局限性方面取得了很大进展，但是市场上与RNAi相关的产品数量十分有限。目前，杀虫RNAi最先进的应用途径（涉及商业部署和监

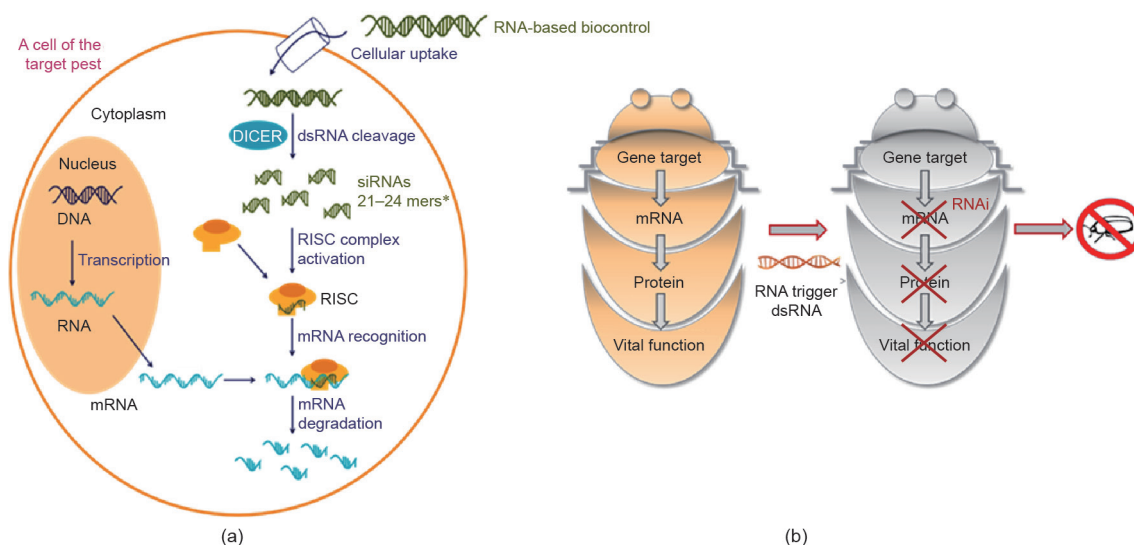


图1. (a) RNAi的分子机理；(b) 利用RNAi进行昆虫防治的原理。DICER：核糖核酸酶的名称；RISC：RNA诱导沉默复合体；siRNA：小干扰RNA。*：多核苷酸长度为21~24个碱基。

管评估)是通过基因修饰(GM),利用一个解除管制的转基因作物,在植物体内产生昆虫特异性dsRNA作为PIP,特异性杀死玉米根虫(CRW)和玉米根萤叶甲(*Diabrotica virgifera virgifera*)。该产品名叫SmartStax Pro,它包含一个靶向*Snf7*基因的dsRNA,可减少高CRW密度下的根损伤并延长Cry3Bb1和Cry34Ab1/Cry35Ab1的耐用性[21],但是该产品尚未上市。可以预期,在RNAi的转基因应用领域将有重大的竞争,重点是具有巨大潜在市场规模的作物的害虫,以抵消与解除转基因产品管制有关的高开发成本和管理成本。

幸运的是,dsRNA AI也可以在局部使用,随后将在敏感性昆虫中引发效应[17,22]。一个关键的要求是昆虫通过取食方式摄入AI,因为dsRNA介导的控制可仅仅通过接触途径实现并未得到证实。因此,利用现有的农事活动对dsRNA AI进行喷洒,使害虫取食处理过的作物,是一种可行的控制昆虫途径。许多学术团体、政府和工业企业都在采用这种方法[23]。这种方法的主要优势包括:能够快速应对不断变化的虫害压力、具有解决重要但利基的市场问题的潜力、使得原本在某些作物中不可使用的转基因技术变得可行,以及降低当前的监管成本。

常见的一些害虫种类对dsRNA介导控制的内在敏感性差异很大,迄今为止,通过取食摄入AI来防控鞘翅目昆虫,已得到最广泛的验证和表征[17,24],然而,在田间环境中通过局部施用而获得的可处理性并不适用于所有甲虫类物种。这种易感性的变化可能源于多种因素,包括行为、物理位置(如植物内部或土壤中的幼虫)以及昆虫细胞对AI缺乏适量的吸收。在实验室和温室条件下,半翅目昆虫也表现出易感性[25,26],且与鞘翅目昆虫相比,可观察到的反应具有更大的变异性[27]。遗憾的是,鳞翅目昆虫作为最具破坏性的昆虫目之一,一直特别难以通过基于RNA的方法进行控制。尽管许多文献都已经表明,RNAi介导的基因敲除是可行的,并且在某些情况下会导致害虫的低死亡率[28],但是dsRNA引发的反应仍存在缺乏稳健性和一致性问题。由于可能存在潜在的解决这些问题的方案,所以鳞翅目昆虫的防控仍然是一个热门的研究领域。通过尝试应用新的dsRNA方法防控这些昆虫的报道出现了一定的规律性[29,30]。RNAi效应特征不明显的害虫种类(相对较小的研究工作)包括臭虫[31]、蚜虫[26]和食草螨[32]。有趣的是,有报道称:利用dsRNA开发了一种针对蜂寄生的瓦罗螨的控制程序[33]。

4. 基于RNA的生物防治在农作物保护中的优势和局限性

基于RNA的生物防治为农作物保护提供了一种新颖的产品,与传统的以化学品保护农作物的方式不同,它们的巨大潜力来源于其他方式。正如上面提到的,与目前使用的农作物保护产品相比,dsRNA防控提供了一种完全不同的作用方式,适合在有害生物综合治理(IPM)中使用,以延迟或降低害虫对现有化学治理方案产生的抗性。与传统的保护农作物的化学品类似,新型的基于RNA的生物防控方法将从这种IPM系统中受益,因为生物防控无法对耐药性的发展产生免疫[34]。由于特定基因序列存在靶向性机制,使实现更高水平的选择性成为可能,这与传统化学防控的方法完全不同,甚至可实现对某种单一物种的选择性控制,同时保持害虫防治剂对来自密切相关属的其他物种不起作用[如图2所示,两种鞘翅目害虫——科罗拉多马铃薯甲虫(CPB)和芥菜叶甲虫(MLB)之间的选择性]。这种选择性,以及许多动物对dsRNA普遍存在的摄取障碍,可能使基于RNA的生物控制有更具吸引力的安全性,并显著降低包括有益昆虫在内的非靶标生物(NTO)的风险。然而,这种高选择性是有代价的,因为它具有降低固有有害生物谱的潜在效果,这可能会限制可寻址的农学用途。

RNA分子是由多核苷酸组成的,具有不稳定性,尤其在土壤等恶劣环境中,因此dsRNA是可生物降解的;分解产物(即单个核苷酸)大量存在于一切生物环境中,且长期以来被证明可安全食用。然而,当针对这种恶劣

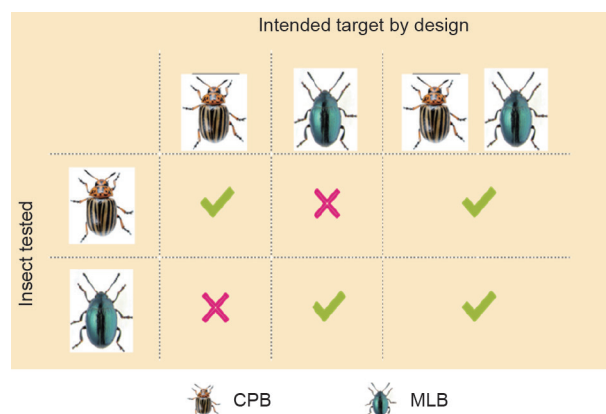


图2. RNAi选择性设计示例。用两个物种同时具有的一个保守靶基因的dsRNA片段处理了两个亲缘关系密切的叶甲CPB和MLB。单一片段仅在本地甲虫中有效,而CPB和MLB片段的组合在两者中均有效。

环境中存在的有害生物时，这种极端的不稳定性可能是一个严重的障碍，因为它需要一定的配方来平衡dsRNA最终被降解的不稳定性和保持足够的杀虫活性。在较温和的环境中，如在叶子表面，测试表明复配的材料在田间具有足够的光稳定性和耐雨水冲刷性，这为该产品的商业化提供保障。

dsRNA防控的下游产品PIP具有许多与它相同的优点，同时也受到与局部应用dsRNA相同的许多限制，关键的区别来源于生产方式。最大的不同是，产生dsRNA分子的转基因植物实际上将从其他系统存在中获益，而目前为止，这是局部应用dsRNA无法获得的。这意味着AI不受农作物环境中存在的许多降解因素的影响，并且在整个植物生命周期中可对其进行保护，而无需喷洒农药。然而，这种方法同时也伴随着巨大的挑战。相对来说，最大的缺点是，添加剂和共制剂的存在可以使局部应用的dsRNA受益，这些添加剂和共制剂旨在保护dsRNA免受核酸酶的影响[36,37]，这是解决具有高度降解的肠道环境的顽强害虫的关键点，而且这也是通过转基因技术的应用不容易实现的。表1总结了基于RNA的治理方案在植物体内与植物体外应用的优势和局限性。

5. 基于RNA的生物防治在农作物保护中的应用

目前，学术界和工业界正在开展大量研究工作，以确定针对商业作物有害生物物种的基于RNA的控制方法[23]。本节示例了一些以RNA为基础的生物防治CPB、CRW和SSB的最新研究进展。

植物体外应用基于RNA的生物防治的一般原理如图3所示。将dsRNA生物防治产品喷到植物上；当害虫

取食植物时会同时摄入防治产品，并被害虫的细胞吸收。一旦进入细胞，RNAi过程就会被触发来阻止目标害虫中必需蛋白质的合成，最终在害虫对作物造成过多损害前控制它。一旦害虫得到控制，这种植物就会成熟，并生产作物。如果设计强调选择性，基于RNA的生物防治还可以降低对非目标昆虫的威胁（图3）。

5.1. 对于CPB的防治

CPB (*Leptinotarsa decemlineata*)是一种受到广泛关注的害虫。这种以马铃薯为食的贪婪害虫是通过基于RNA的生物防治进行控制的理想物种，因为它对RNAi效应具有高度敏感性和有效性。CPB幼虫和成虫栖息于植物表面，并损害这些植物，好在叶面易于处理，且容易被食用。通过实验室水平的检测（包括体外和植物体上）得到害虫死亡率和植物保护情况，结果表明，上述特点使生物防控非常有效。先正达公司内部对此实验做了进一步的研究，并已成功地将这种实验室水平的害虫防治转化为田间防疫，如图4所示。

用田间试验中使用的对CPB有效的dsRNA进行NTO筛选，结果显示了极好的安全性和靶标选择性（图5）。可以从以下网站访问对CPB有效的dsRNA方法的数据集：<http://opendata.syngenta.agroknow.com/rna>。

5.2. 对于CRW的防治

先正达公司还在努力将CPB研究计划的成果扩展到其他害虫，虽然针对CRW的转基因应用正在积极进行（目前有一种产品上市），但在某些市场和地区（如欧洲），可喷洒的应用方法可能会更有利。基于RNA的土壤害虫生物防治面临着严峻的土壤环境挑战。如果要与目前市场上销售的化学药品的功效相当，RNA防治剂必须在原地维持数周的生物有效性。但是，土壤中的生

表1 基于RNA的治理方案在植物体内与植物体外应用之间的优缺点

Category	Application	
	<i>In planta</i> (PIP, GM)	<i>Ex planta</i> (spray application)
Advantages	<ul style="list-style-type: none"> • Systemic presence/expression • Season-long presence possible • No spraying needed • Protection from environmental degradants (e.g., RNases) 	<ul style="list-style-type: none"> • Lower development costs • Formulation can increase stability and bioavailability • Adaptation of application rates • Application on multiple crops/varieties
Disadvantages	<ul style="list-style-type: none"> • Higher development cost • Not possible to change properties via co-formulation • Application rates fixed • Only possible in crops where GM is feasible/acceptable 	<ul style="list-style-type: none"> • AIs only present on the surface • Requires spraying • May need multiple applications to cover whole season

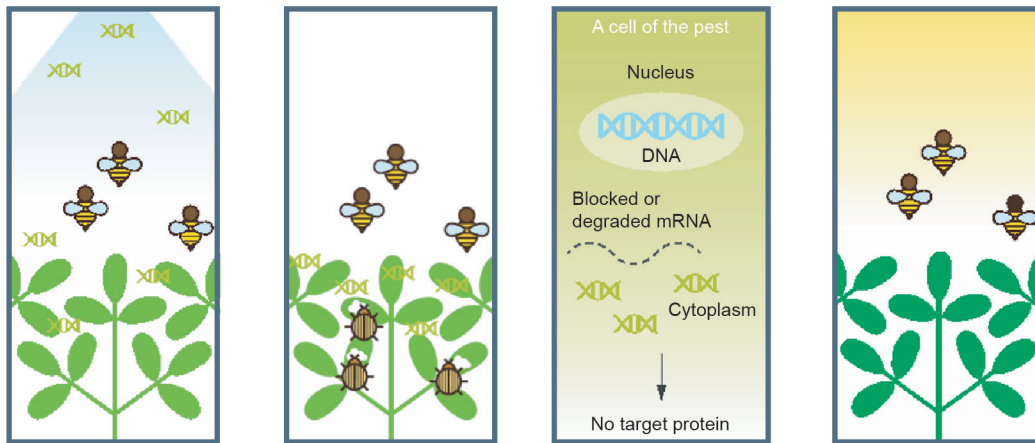


图3. 基于RNA的生物防治在作物保护中的应用。



图4. 2015年, 通过局部应用dsRNA来防治CPB的田间试验。马铃薯田遭受CPB的严重侵害。与化学控制标准相当的商业化合理应用以保护植物。(a) 基于RNA的生物防治处理试验田; (b) 附近未经处理的对照试验田。

SPECIES	COMMON NAME	ORDER	BIOLOGICAL ACTIVITY	
<i>Spodoptera littoralis</i>	Cotton leafworm	Lepidoptera	No	
<i>Plutella xylostella</i> *	Diamondback moth	Lepidoptera	No	
<i>Bemisia tabaci</i> *	Silverleaf white fly	Hemiptera	No	
<i>Aonidiella aurantii</i>	Red scale	Hemiptera	No	
<i>Aphis craccivora</i>	Cowpea aphid	Hemiptera	No	
<i>Myzus persicae</i> *	Green peach aphid	Hemiptera	No	
<i>Nilaparvata lugens</i> *	Brown plant hopper	Hemiptera	No	
<i>Orius laevigatus</i>	Flower bug	Hemiptera	No	
<i>Aphidius colemani</i>	Parasitic wasp	Hymenoptera	No	Beneficials
<i>Apis mellifera</i> *	Honey bee	Hymenoptera	No	
<i>Typhlodromus pyn</i> *	Predatory mite	Acarina	No	
<i>Tetranychus urticae</i>	Spider mite	Trombidiformes	No	
<i>Frankliniella occidentalis</i>	Western flower thrip	Thysanoptera	No	
<i>Callosobruchus maculatus</i>	Cowpea weevil	Coleoptera	No	
<i>Diabrotica undecimpunctata</i> *	Spotted cucumber beetle	Coleoptera	No	Family: chrysomelidae
<i>Diabrotica barberi</i>	Northern corn rootworm	Coleoptera	No	
<i>Diabrotica balteata</i>	Banded cucumber beetle	Coleoptera	No	
<i>Diabrotica virgifera virgifera</i> *	Western com rootworm	Coleoptera	No	
<i>Phaedon cochleariae</i>	Mustard leaf beetle	Coleoptera	No	
<i>Leptinotarsa decemlineata</i> *	Colorado potato beetle	Coleoptera	Yes	

图5. 在CPB上测试的CPB dsRNA对其他昆虫物种和益虫的选择性示例。*: 文献中显示的对dsRNA介导的RNA干扰有反应的物种。

物环境含有大量的微生物和核酸酶, 可导致未受保护的dsRNA迅速降解。先正达公司利用其在AI制剂中的经验来提高dsRNA生物防治在恶劣环境中的稳定性, 从而显著改善了AI在土壤中的稳定性, 如图6所示。

5.3. 对于SSB的防治

另一个研究项目的防治目标是大豆臭虫, 已证实大

豆害虫对dsRNA生物防治具有先天的易感性, 然而在生物学和进食行为方面, 也明确了需要克服的特定挑战。为了确保大豆害虫可以经口摄入防治药品, dsRNA必须在害虫产生的大量的唾液核酸酶中存活[38], 且刺吸式口器害虫(如臭虫)与咀嚼式口器害虫(如CPB)相比, 本身取食的含喷洒药物的叶片较少, 综合以上事实考虑, 在这些条件下引发RNAi效应是一个巨大的挑战。

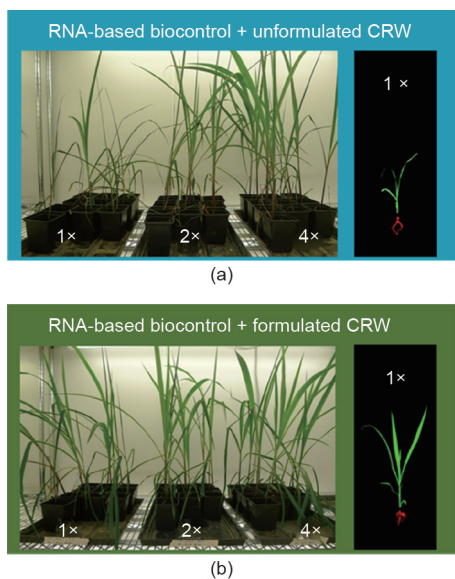


图6. 未受保护(a)和受保护(b)的dsRNA靶向防治CRW的生物测定。每株植物都有CRW幼虫,并在相同条件下培育。通过多种施用率测试,结果表明:dsRNA在检测期间全程保护植物。配方的dsRNA对降解具有保护作用,因而防治作用更强。

这是先正达公司应用配方专业知识以提高基于RNA的生物防治的稳定性和可用性的另一领域。我们尝试用特定dsRNA处理大豆植物,以保护其免受臭虫之类的害虫的侵袭,如图7所示。

6. 总结与展望

最近的研究表明,基于RNA的生物防治正在成为现有作物保护库中极有价值的新兴方式。它们具有独特的作用方式,可以通过基因改造和生物防治两种方法实施,且有望在IPM系统中发挥重要作用,这一点已通过解除管制和销售首个基于RNA的玉米PIP商品得到了明确的证明。随着监管机构和社会施加越来越大的压力,以反对现有的广谱化学防治,这种发展对于农户来说,是一个巧合的机遇。人们期望未来的杀虫剂具有选择性和可持续性,而基于RNA的AI满足了这种要求,由于它们利用了自然过程来发挥控制作用,并且具有极高的选择性,从而降低了NTO的风险。在实现基于RNA的产品的推广及其广泛使用和应用的道路上,仍然存在许多挑战,包括与传统化学药品防控相比,基于RNA的产品控制速度相对较慢,以及在不同虫害群体中响应水平的变化等。尽管近年来取得了长足进步,但具有成本效益的大规模生产仍是一个挑战,具有成本效益的大规模生产仍然是一个难题。然而,可以预期的

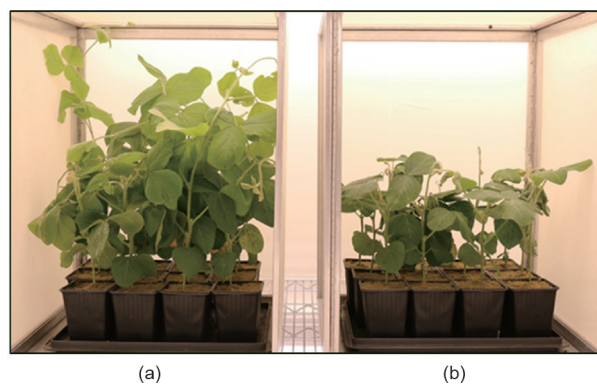


图7. 大豆植株经靶向臭虫类害虫的特异性dsRNA生物防治(a)和阴性对照dsRNA序列(b)处理。用成虫和各个生长阶段的幼虫感染植株,并在相同条件下培育,进行生物防治后的植物明显生长得更好。

是,基于RNA的AI将成为有极高价值的新工具,以补充当前的农作物保护解决方案库。

Acknowledgements

The authors would like to thank Pat Bauman, Mike Bean, Andrea Burns, Sonia Herrero, Duncan Oliver, Katja Schlink, Elke Schmidt, and Jason Vincent for reviewing the manuscript and for the stimulating discussions.

Compliance with ethics guidelines

Matthew Bramlett, Geert Plaetinck, and Peter Maienfisch declare that they have no conflict of interest or financial conflicts to disclose.

References

- [1] Maienfisch P, Stevenson TM. Modern agribusiness—markets, companies, benefits and challenges in discovery and synthesis of crop protection. In: Maienfisch P, Stevenson TM, editors. *Discovery and synthesis of crop protection products*. Washington, DC: American Chemical Society; 2015. p. 1–13.
- [2] Philipps McDougall agribusiness [Internet]. London: IHS Markit; c2020 [cited 2019 Jan 3]. Available from: <https://phillipsmcdougall.agribusiness.ihsmarkit.com>.
- [3] Biologicals 2018—an analysis of corporate, product and regulatory news in 2017/2018 [Internet]. London: IHS Markit; c2020 [cited 2019 Jan 3]. Available from: https://agrow.agribusinessintelligence.informa.com/-/media/agri/agrow/ag-market-reviews-pdfs/supplements/agrow_biologicals_2018_online.pdf.
- [4] Marshall P. Agricultural biologicals today and tomorrow: potential and regulations [Internet]. Ottawa: Canadian Seed Trade Association; c2020 [cited 2019 Jan 3]. Available from: <https://seedinnovation.ca/wp-content/uploads/2015/07/Agricultural-Biologicals-today-and-tomorrow-Pete-Marshall.pdf>.
- [5] Marketsandmarkets.com [Internet]. Biopesticides market research report; c2009–2019 [cited 2019 Jan 3]. Available from: <https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/biopesticides-267.html>.
- [6] Price DRG, Gatehouse JA. RNAi-mediated crop protection against insects. *Trends Biotechnol* 2008;26(7):393–400.

- [7] Obbard DJ, Gordon KHJ, Buck AH, Jiggins FM. The evolution of RNAi as a defense against viruses and transposable elements. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2009;364(1513):99–115.
- [8] Elliott D, Ladomery M. *Molecular biology of RNA*. Oxford: Oxford University Press; 2011.
- [9] Mamta B, Rajam MV. RNAi technology: a new platform for crop pest control. *Physiol Mol Biol Plants* 2017;23(3):487–501.
- [10] Stach JEM, Good L. Synthetic RNA silencing in bacteria-antimicrobial discovery and resistance breaking. *Front Microbiol* 2011;2:185.
- [11] McManus MT, Sharp PA. Gene silencing in mammals by small interfering RNAs. *Nat Rev Genet* 2002;3(10):734–47.
- [12] Auer C, Frederick R. Crop improvement using small RNAs: applications and predictive ecological risk assessments. *Trends Biotechnol* 2009;27(11):644–51.
- [13] Burand JP, Hunter WB. RNAi: future in insect management. *J Invertebr Pathol* 2013;112(Suppl):S68–74.
- [14] Younis A, Siddique MI, Kim CK, Lim KB. RNA interference (RNAi) induced gene silencing: a promising approach of hi-tech plant breeding. *Int J Bilo Sci* 2014;10(10):1150–8.
- [15] Zhang J, Khan SA, Hasse C, Ruf S, Heckel DG, Bock R. Full crop protection from an insect pest by expression of long double-stranded RNAs in plastids. *Science* 2015;347(6225):991–4.
- [16] Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, et al. The nuclear RNase III Droscha initiates microRNA processing. *Nature* 2003;425(6956):415–9.
- [17] Baum JA, Bogaert T, Clinton W, Heck GR, Feldmann P, Ilagan O, et al. Control of coleopteran insect pests through RNA interference. *Nat Biotechnol* 2007;25(11):1322–6.
- [18] Shen W, Yang G, Chen Y, Yan P, Tuo D, Li X, et al. Resistance of non-transgenic papaya plants to *Papaya ringspot virus* (PRSV) mediated by intron-containing hairpin dsRNAs expressed in bacteria. *Acta Virol* 2014;58(3):261–6.
- [19] Scorza R, Callahan A, Dardick C, Ravelonandro M, Polak J, Malinowski T, et al. Genetic engineering of *Plum pox virus* resistance: 'HoneySweet' plum—from concept to product. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 2013;115(1):1–12.
- [20] Gupta A, Pal RK, Rajam MV. Delayed ripening and improved fruit processing quality in tomato by RNAi-mediated silencing of three homologs of 1-aminopropane-1-carboxylate synthase gene. *J Plant Physiol* 2013;170(11):987–95.
- [21] Head GP, Carroll MW, Evans SP, Rule DM, Willse AR, Clark TL, et al. Evaluation of SmartStax and SmartStax PRO maize against western corn rootworm and northern corn rootworm: efficacy and resistance management. *Pest Manag Sci* 2017;73(9):1883–99.
- [22] Whyard S, Singh AD, Wong S. Ingested double-stranded RNAs can act as species-specific insecticides. *Insect Biochem Molec* 2009;39(11):824–32.
- [23] Jalaluddin NSM, Othman RY, Harikrishna JA. Global trends in research and commercialization of exogenous and endogenous RNAi technologies for crops. *Crit Rev Biotechnol* 2018;39(1):67–78.
- [24] Palli SR. RNA interference in Colorado potato beetle: steps toward development of dsRNA as a commercial insecticide. *Curr Opin Insect Sci* 2014;6:1–8.
- [25] Luo Y, Chen Q, Luan J, Chung JL, Eck JV, Turgeon R, et al. Towards an understanding of the molecular basis of effective RNAi against a global insect pest, the whitefly *Bemisia tabaci*. *Insect Biochem Mol Biol* 2017;88:21–9.
- [26] Yu XD, Liu ZC, Huang SL, Chen ZQ, Sun YW, Duan PF, et al. RNAi-mediated plant protection against aphids. *Pest Manag Sci* 2016;72(6):1090–8.
- [27] Christiaens O, Smagghe G. The challenge of RNAi-mediated control of hemipterans. *Curr Opin Insect Sci* 2014;6:15–21.
- [28] Terenius O, Papanicolaou A, Garbutt JS, Eleftherianos I, Huvenne H, Kanginakudru S, et al. RNA interference in Lepidoptera: an overview of successful and unsuccessful studies and implications for experimental design. *J Insect Physiol* 2011;57(2):231–45.
- [29] Choi MY, Vander Meer RK. Phenotypic effects of PBAN RNAi using oral delivery of dsRNA to corn earworm (Lepidoptera: Noctuidae) and tobacco budworm larvae. *J Econ Entomol* 2018;112(1):434–9.
- [30] Wang J, Gu L, Knipple DC. Evaluation of some potential target genes and methods for RNAi-mediated pest control of the corn earworm *Helicoverpa zea*. *Pestic Biochem Physiol* 2018;149:67–72.
- [31] Mogilicherla K, Howell JL, Palli SR. Improving RNAi in the brown marmorated stink bug: identification of target genes and reference genes for RT-qPCR. *Sci Rep* 2018;8(1):3720.
- [32] Kwon DH, Park JH, Lee SH. Screening of lethal genes for feeding RNAi by leaf disc-mediated systematic delivery of dsRNA in *Tetranychus urticae*. *Pestic Biochem Physiol* 2013;105(1):69–75.
- [33] Garbian Y, Maori E, Kalev H, Shafir S, Sela I. Bidirectional transfer of RNAi between honey bee and *Varroa destructor*: *Varroa* gene silencing reduces *Varroa* population. *PLoS Pathog* 2012;8(12):e1003035.
- [34] Khajuria C, Ivashuta S, Wiggins E, Fligel L, Moar W, Pleau M, et al. Development and characterization of the first dsRNA-resistant insect population from western corn rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte. *PLoS ONE* 2018;13(5):e0197059.
- [35] Dubelman S, Fischer J, Zapata F, Huizinga K, Jiang C, Uffman J, et al. Environmental fate of double-stranded RNA in agricultural soils. *PLoS ONE* 2014;9(3):e93155.
- [36] Castellanos NL, Smagghe G, Sharma R, Oliveira EE, Christiaens O. Liposome encapsulation and EDTA formulation of dsRNA targeting essential genes increase oral RNAi-caused mortality in the Neotropical stink bug *Euschistus heros*. *Pest Manag Sci* 2019;75(2):537–48.
- [37] Christiaens O, Tardajos MG, Martinez Reyna ZL, Dash M, Dubrue P, Smagghe G. Increased RNAi efficacy in *Spodoptera exigua* via the formulation of dsRNA with guanylated polymers. *Front Physiol* 2018;9:316.
- [38] Lomate PR, Bonning BC. Distinct properties of proteases and nucleases in the gut, salivary gland and saliva of southern green stink bug, *Nezara viridula*. *Sci Rep* 2016;6:27587.