

DOI:10.13718/j.cnki.zwyyx.2025.04.001

# 基于纳米载体的 dsRNA 杀菌剂研究进展

丁晓杰<sup>1</sup>, 李佳轶<sup>2</sup>, 周如军<sup>1</sup>, 吴元华<sup>1</sup>

1. 沈阳农业大学 植物保护学院, 沈阳 110866;

2. 四川省烟草公司 德阳市公司, 四川 德阳 618000

**摘要:** 植物病害每年给农作物产量带来巨大损失, 寻找新的绿色防控策略对粮食安全生产至关重要。基于 RNA 干扰(RNA Interference, RNAi)原理发展而来的喷雾诱导基因沉默(Spray-induced Gene Silencing, SIGS), 通过在植物上喷施外源双链 RNA(Double-stranded RNA, dsRNA), 干扰病原菌的生长或致病相关基因的正常表达, 从而实现病害的防控, 该技术在植物保护领域展现出巨大的应用潜力。然而, dsRNA 的稳定性差及递送效率低等问题亟待解决。纳米材料的应用可以有效保护 dsRNA 不被降解, 提高其递送效率, 并延长对作物的保护时间, 从而提升 dsRNA 对植物病害的防治效果。本文综述了基于纳米载体的 dsRNA 杀菌剂的发展历程及其在植物病害防控领域的研究现状, 并对行业未来发展前景进行了展望。

**关键词:** RNA 干扰; SIGS; dsRNA;

纳米载体; 绿色防控

中图分类号: S482

文献标识码: A

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



文章编号: 2097-1354(2025)04-0001-11

## Advances of Research on dsRNA Fungicides Based on Nanocarriers

DING Xiaojie<sup>1</sup>, LI Jiayi<sup>2</sup>, ZHOU Rujun<sup>1</sup>, WU Yuanhua<sup>1</sup>

1. College of Plant Protection, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China;

2. Deyang Branch of Sichuan Province Tobacco Company, Deyang Sichuan 618000, China

**Abstract:** Plant diseases cause huge losses in crop yields every year, the new green control strategies are crucial for agricultural production and food security. Spray-induced gene silencing (SIGS), which is developed based on the principle of RNA interference (RNAi), can be imple-

收稿日期: 2024-11-29

基金项目: 德阳雪茄烟粮融合生产技术体系建立与应用示范(SCYC202423)。

作者简介: 丁晓杰, 博士研究生, 主要从事植物病害生物防治研究。

通信作者: 周如军, 博士, 教授。

mented by spraying double-stranded RNA (dsRNA) externally on the surface of plants. dsRNA interferes with the growth or the normal expression of disease-related genes of pathogens to achieve prevention and control effect on diseases. This technology has shown great potential in the field of green plant protection. However, the challenges of poor stability and low delivery efficiency of dsRNA becomes a pressing problem of the day. The application of nanomaterials can effectively protect dsRNA from degradation, improve the delivery efficiency of dsRNA and prolong the protective duration for crops, thereby enhancing the effectiveness of dsRNA in controlling plant diseases. In this paper, the development of fungicides based on dsRNA-nanocarriers and its research status in the field of plant disease control were reviewed, and the future development of the industry was prospected.

**Key words:** RNA interference; SIGS; dsRNA; nanocarriers; green prevention and control

基于 RNA 干扰(RNA Interference, RNAi)技术开发的外源双链 RNA(Double-stranded RNA, dsRNA),能够精确诱发植物病原菌内特定基因的沉默,进而引起靶标生物的非正常生长或致病力降低,从而达到防治农作物病害的目的,也被称为 RNA 生物农药<sup>[1]</sup>。dsRNA 杀菌剂采用传统的喷洒方式,在不干扰植物遗传表达的情况下,仅抑制有害生物靶标基因的正常表达,其作用机制独特、选择性强且安全性高。然而,dsRNA 的不稳定性及病原菌对 dsRNA 的吸收效率低等问题,仍是其广泛应用的重要限制因素。纳米载体对 dsRNA 的保护和递送,为 RNA 生物农药的发展提供了新的思路。以纳米材料为载体的新型 dsRNA 杀菌剂具有靶标特异性高、可天然降解、普适性强等优点,被认为是“农药史上第三次革命”的核心产品<sup>[2]</sup>。

## 1 dsRNA 杀菌剂的发展历程

### 1.1 RNAi 的发现及 SIGS 原理

RNA 干扰现象广泛存在于植物、动物、真菌和病毒中,是高度保守的基因表达调控工具<sup>[3-6]</sup>。1998 年,Fire 等<sup>[7]</sup>在秀丽隐杆线虫中首次发现外源或内源的 dsRNA 插入可以促进其同源性较高的 mRNA 降解,进而特异性抑制基因活性,自此将该现象称为 RNA 干扰。其具体机制是,生物体能够利用自身体内的多种 Dicer-like(DCL)酶将长的 dsRNA 切割成 21~24 nt 的 siRNA,随后这些 siRNA 的其中一条链与动植物体内的核酸外切酶、解旋酶、核酸内切酶以及 Argonaute(AGO)蛋白等物质结合,形成 RNA 诱导沉默复合体(RNA-Induced Silencing Complex, RISC)。该复合体被激活后,以 siRNA 的其中一条链为指导,特异性的降解与其同源的 mRNA,使该基因丧失表达活性,从而达到沉默相关基因的目的<sup>[8]</sup>。在 siRNA 与靶标 mRNA 结合后,生物体会利用 RNA 依赖的 RNA 聚合酶(RNA-dependent RNA Polymerase, RdRP),以靶标基因 mRNA 为模板,再次形成新的 dsRNA<sup>[9]</sup>。由于 RdRP 的存在,使得少量的 dsRNA 便能够引发明显的基因沉默现象。

RNAi 技术是研究基因功能的重要工具之一,在 RNAi 研究基础上首先发展而来的是寄主诱导的基因沉默(Host-Induced Gene Silencing, HIGS)<sup>[10]</sup>。国内学者利用 HIGS 技术在棉花中表达大丽轮枝菌疏水蛋白基因 *hygrophobins 1(VdH1)*,接种后阻碍了病原菌微菌核的形成,构建了棉花黄萎病抗病体系,田间试验表明棉花抗病效果良好<sup>[11]</sup>。但 HIGS 技术也有不足之处,其仅适用于具备遗传转化体系的作物,并且受到培育周期长及伦理道德等问题的影响,导致该技术在植物病害防控领域的应用进展缓慢。喷雾诱导基因沉默(Spray-Induced Gene Silencing, SIGS)是在 HIGS 研究基础上发展而来的非转基因 RNA 干扰策略,该策略通过对植物外源喷洒靶向病原菌生长或致病关键基因的 dsRNA,触发病原体或植物内的 RNA 干扰途径,抑制特

定基因的表达,从而杀灭病原体或提升作物抗病能力<sup>[12]</sup>。如图1所示, SIGS 技术采用传统的施药方式,避免了转基因技术带来的生态安全不确定性,同时利用 RNAi 原理实现了植物病害的有效防控。这种喷洒型 dsRNA 杀菌剂能够特异性作用于有害生物的关键生长相关基因或致病基因,代表了新一代环境友好型绿色农药。

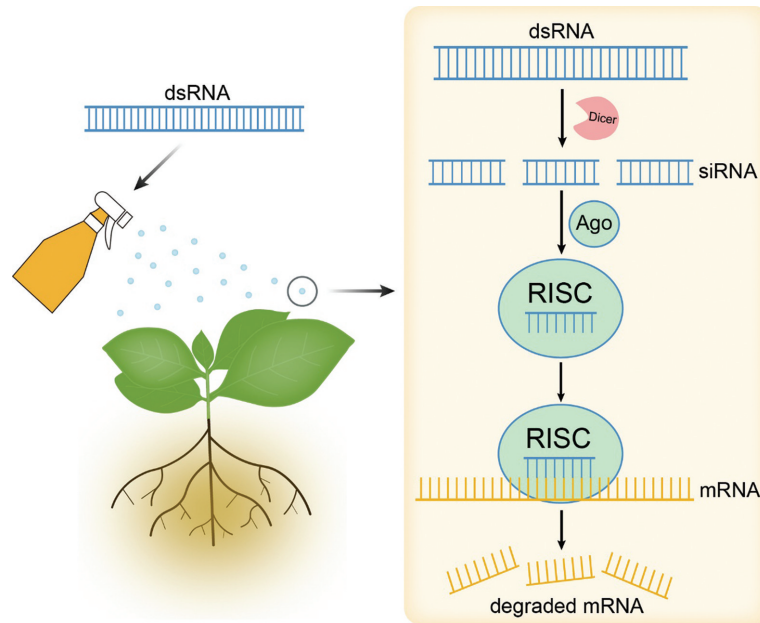


图1 SIGS 技术防控植物病害原理

## 1.2 dsRNA 杀菌剂在植物病害防控领域的应用

### 1.2.1 喷施 dsRNA 防控植物病害

利用 dsRNA 杀菌剂进行植物真菌病害防治被认为是具有巨大潜力的防控策略。例如,由镰刀菌引起的植物病害中,多个靶标基因已被证明具有良好的防控效果。用体外合成靶向镰刀菌麦角甾醇生物合成基因的 dsRNA(CYP3-dsRNA)直接喷洒大麦,可以有效抑制系统叶片组织中镰刀菌的发育,实现病害防控<sup>[13]</sup>;喷施靶向镰刀菌生长关键蛋白  $\beta 2$ -tubulin 的 dsRNA,赋予植物对多种植物病原体的抗性,表现出较强的基因沉默效率<sup>[14]</sup>;喷施体外合成的尖孢镰刀菌 RNAi 组分 RDR1(*FolRDR1*)基因的 dsRNA,可有效防控番茄枯萎病的发生并抑制 *FolRDR1* 基因的表达<sup>[15]</sup>。靶向真菌 RNAi 机制组分 DCL 和 AGO 基因的 dsRNA,可以保护大麦叶片免受镰刀菌侵染<sup>[16]</sup>。dsRNA 杀菌剂除了在防控镰刀菌研究较多外,对其他真菌病害也有相关报道,例如,由葡萄孢菌侵染引起的灰霉病,该病严重降低作物的产量和品质,分别在水果、蔬菜和花卉表面喷施靶向葡萄孢菌 RNAi 关键组分 DCL1 和 DCL2 基因的 dsRNA,能够有效抑制病灶大小<sup>[17]</sup>;由真菌 *Magnaporthe oryzae* 引起的稻瘟病是水稻第一大病害,外源喷施 dsRNA 可降低宿主防御,抑制致病基因 *MoDES1* 的表达,赋予了水稻对稻瘟病的抗性<sup>[18]</sup>;大豆锈病的爆发给大豆带来严重的产量损失,将体外合成编码大豆锈病病原菌乙酰辅酶 A 酰基转移酶(ATC)、40S 核糖体蛋白 S16(RP\_S16)和甘氨酸切割系统 H 蛋白(GCS\_H)3 个基因的 dsRNA 喷洒在离体大豆叶片上,与对照组相比,大豆叶片上的脓疱数量平均减少了 73% 以上,真菌积累量减少了 75% 以上<sup>[19]</sup>;喷施靶向 *Phakopsora pachyrhizi* 的效应因子 *PpAE1*、*PpAE2*、*PpAE3* 的 dsRNA,通过抑制植物免疫应答从而降低大豆锈病的发病程

度<sup>[20]</sup>。此外, SIGS 技术还被应用于防治其他病原真菌, 包括 *Austropuccinia psidii*<sup>[21]</sup>、*Rhizoctonia solani*<sup>[22-23]</sup>、*Sclerotinia sclerotiorum*<sup>[24]</sup>、*Verticillium dahliae*<sup>[25]</sup> 和 *Venturia inaequalis*<sup>[26]</sup> 等。

针对卵菌病害一直缺乏特异性强的农药, 利用 dsRNA 杀菌剂进行防治可能会带来巨大突破。疫霉菌是对多种作物造成重大影响的病原菌, 喷施对靶向疫霉菌至关重要的吸器膜蛋白 (*PiHmp1*) 的 dsRNA, 可显著提高马铃薯对晚疫病的抗性<sup>[27]</sup>; 外源喷施靶向致病疫霉菌热休克蛋白 90 (*Hsp-90*)、翻译延伸因子 1 $\alpha$  (*EF-1 $\alpha$* ) 和山梨醇脱氢酶 (*SDH*) 的 dsRNA, 可显著减轻马铃薯晚疫病的症状<sup>[28]</sup>; 喷施针对疫霉菌中 2 个必需基因纤维素合酶 (*Ces3*) 和氧化固醇结合蛋白 (*OSBP-2*) 的 dsRNA, 可显著降低辣椒疫霉菌的感染和繁殖能力<sup>[29]</sup>。

SIGS 技术在植物病毒病防控中的应用比较早, 且对多种病毒病均具有较好的防控效果。例如, 研究者们使用大肠杆菌菌株 HT115 (DE3) 来表达辣椒轻斑驳病毒 (Pepper Mild Mottle Virus, PMMoV) 的复制酶基因 (*IR54*) 和李痘病毒 (Porcine Parvovirus, PPV) *helper component* (*HC*) 基因的 dsRNA, 将这些 dsRNA 喷洒在烟草植株上后, 可以系统性地防治对应病毒病的发生<sup>[30]</sup>, 这一发现为后续开发利用 RNAi 农药防治植物病毒病害奠定了基础; 喷施 dsRNA 使豆类常见花叶病毒 (Bean Common Mosaic Virus, BCMV) 的 *CP* 基因沉默, 显著降低了病毒对植物的侵染程度<sup>[31]</sup>; 以马铃薯 Y 病毒 (Potato Virus Y, PVY) 的 *CP* 基因作为 RNAi 的作用靶标, 显示出较高的病害防控效率<sup>[32]</sup>; 体外合成高效影响烟草花叶病毒 (Tobacco Mosaic Virus, TMV) *CP* 基因和 RNA 依赖的 RNA 聚合酶 (*RdRP*) 基因表达的 dsRNA, 喷施在烟草叶片后, 不仅减轻了病害的发生程度, 还显著降低了种子带毒率<sup>[33-34]</sup>, 喷施 dsRNA 防控病原菌的靶标基因及作用效果见表 1。

表 1 防控病原菌的靶标基因及作用效果

序号	有害生物	RNAi 靶标	作用效果	参考文献
1	<i>Austropuccinia psidii</i>	<i>EF1-<math>\alpha</math></i> 、 <i><math>\beta</math>-Tub</i>	抑制病原菌菌丝或吸器活性	[21]
2	<i>Botrytis cinerea</i>	<i>DCL1+DCL2</i>	抑制病原菌生长和孢子萌发	[17]
3	<i>Fusarium</i> spp.	<i>CYP51A+CYP51B+CYP51C</i>	抑制麦角甾醇的合成, 减弱病原菌生长	[13]
		<i><math>\beta</math>2-tubulin</i>	抑制镰刀菌生长关键蛋白的表达	[14]
		<i>RdRP</i>	缓解番茄枯萎病症状	[15]
		<i>AGO</i> 、 <i>DCL</i>	保护大麦叶片免受侵染	[16]
4	<i>Magnaporthe oryzae</i>	<i>MoDES1</i>	降低致病基因的表达	[18]
5	<i>Phakopsora pachyrhizi</i>	<i>ATC</i> 、 <i>RP_S16</i> 、 <i>GCS_H</i>	真菌生物量下降	[19]
		<i>PpAE1</i> 、 <i>PpAE2</i> 、 <i>PpAE3</i>	显著抑制大豆锈病感染	[20]
6	<i>Phytophthora infestans</i>	<i>PiHmp1</i>	减少叶片感染程度	[27]
		<i>EF-1<math>\alpha</math></i> 、 <i>Hsp-90</i> 、 <i>SDH</i>	病原菌的生长与产孢速率显著下降	[28]
7	<i>Phytophthora capsici</i>	<i>Ces3</i> 、 <i>OSBP-2</i>	降低 <i>P. capsici</i> 的感染和繁殖力	[29]
8	<i>Rhizoctonia solani</i>	<i>TPS2</i>	菌核分化受到抑制	[22]
		<i>endoPGs</i> 、 <i>RPMK1</i>	抑制病斑扩散	[23]
9	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	<i>SSI1G-05899</i> 、 <i>SSI1G-07873</i> 、 <i>SSI1G-09897</i>	显著降低真菌感染程度	[24]
10	<i>Verticillium dahliae</i>	<i>DCTN1+SAC1</i> 、 <i>DCL</i>	减轻病害发病程度	[25]
11	<i>Venturia inaequalis</i>	<i>CIN1</i> 、 <i>CE5</i> 、 <i>VICE12</i> 、 <i>VICE16</i>	靶标基因表达下调	[26]
12	Bean Common Mosaic Virus (BCMV)	<i>CP</i>	降低病毒对植物损害程度	[31]
13	Pepper Mild Mottle Virus (PMMoV)	<i>IR54</i>	干扰病毒侵染	[30]
14	Pepper Mild Mottle Virus (PPV)	<i>HC</i>	提高植物抗病毒能力	[30]
15	Potato Virus Y (PVY)	<i>CP</i>	保护植物免受病毒侵染	[32]
16	Tobacco Mosaic Virus (TMV)	<i>CP</i> 、 <i>RdRP</i>	减少种子带毒率	[33]
		<i>MP</i>	减少病毒积累量	[34]



### 1.2.2 限制 dsRNA 杀菌剂应用发展的技术瓶颈

1) dsRNA 杀菌剂高效靶标基因的筛选。靶标特异性高是 dsRNA 杀菌剂的优势之一,因此获得有害生物高效的 RNAi 靶标基因是研制 dsRNA 杀菌剂的关键。在有害生物的防治研究中,目前面临可选择的高效靶标基因相对较少的问题。由于不同物种中有害生物中的 RNAi 作用机制存在差异,使得同一靶标基因在不同物种中作用机制和功能发挥并不完全一致,这增加了靶标基因筛选的难度。同时,在选择针对目标病原菌特异性基因时,需要考虑其基因同源性和相似性,避免对非靶标生物产生不利影响。因此,有害生物靶标基因选择的过程必须综合考虑多种因素。

2) dsRNA 的稳定性。核心成分的稳定性对于商品化农药的货架期至关重要。dsRNA 本质上是核酸分子,在递送至靶标生物的过程中,容易受到自然界中酶、pH 值、雨水冲刷等因素的影响而发生降解。病原微生物内部的核酸酶和 pH 值也会影响 dsRNA 的稳定性,进而影响 RNAi 效率。经检测发现,dsRNA 在植物叶片表面停留时间仅为 7 d 左右<sup>[15]</sup>,降解速度较快成为限制其应用的关键因素之一。

3) 病原菌对 dsRNA 的吸收效率。dsRNA 成功递送至病原菌胞内是 RNAi 发挥作用的前提。不同种类的病原菌对 dsRNA 的敏感性和吸收机制不同,导致其对 dsRNA 的吸收能力存在差异。研究发现,灰霉病菌(*Botrytis cinerea*)、核盘菌(*Sclerotinia sclerotiorum*)、立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)、黑曲霉菌(*Aspergillus niger*)和大丽轮枝菌(*Verticillium dahliae*)能够以较高的效率吸收 dsRNA,而胶孢炭疽菌(*Colletotrichum gloeosporioides*)则不能够吸收 dsRNA。卵菌致病疫霉(*Phytophthora infestans*)对 dsRNA 的吸收能力随着细胞类型和发育阶段的差异而变化<sup>[25]</sup>。因此,提高 dsRNA 的递送效率或突破病原菌对 dsRNA 的吸收屏障,是提升 dsRNA 杀菌剂利用效率的重要途径。

## 2 纳米材料及提升 dsRNA 利用效率的作用机制

国际标准化组织(International Organization for Standardization, ISO)将任何在外部尺度、内部结构或表面结构上处于纳米尺度(1~100 nm)的材料定义为纳米材料<sup>[35]</sup>。纳米农药是将纳米材料应用于农药研发中,创造出具有良好药效的新型农药。纳米材料与传统农药的结合展现出了广阔的应用前景,为解决植物保护问题提供了新的思路。纳米材料具备尺寸小、比表面积大和吸附能力强等诸多优异的理化性能。常见纳米材料包括聚己内酯、羧甲基壳聚糖、阳离子星状聚合物、纳米 TiO<sub>2</sub> 和壳聚糖等,作为高效载体装载农药<sup>[36-41]</sup>,能够有效改善农药的水分散性、增加农药在叶表面的接触面积、减少施药次数并降低使用剂量,从而提高农药的有效利用率。纳米材料被应用于 dsRNA 递送系统,推动了 dsRNA 杀菌剂的应用。dsRNA 杀菌剂的纳米递送载体主要分为以下几类:①天然聚合物类纳米载体,例如,壳聚糖、脂质体、木质素和多肽等;②合成聚合物类纳米载体,例如,阳离子星状聚合物、聚乙烯亚胺、聚乙二醇等;③无机非金属类纳米载体,例如,介孔二氧化硅、纳米粘土和碳纳米材料等<sup>[42]</sup>。纳米材料通过吸附、偶联、包裹和镶嵌等方式装载 dsRNA,有效提升核酸的利用效率,为植物病害防控提供了一种变革性的方法(表 2)。

表2 纳米载体及其在 dsRNA 杀菌剂中的作用

序号	纳米材料	作用	参考文献
1	功能化碳量子点(CDs)	静电吸附 dsRNA, 突破 <i>P. capsici</i> 吸收 dsRNA 屏障	[29]
2	壳聚糖季铵盐(HACC)	提高 dsRNA 利用效率	[33]
3	层状双氢氧化物(LDH)	延缓 dsRNA 的释放, 延长对作物的保护时间	[43]
4	脂质体(CLPs、ALPs)	将 dsRNA 包裹, 有效保护其不被核酸酶降解	[44]
5	星型阳离子聚合物(SPC)	提高 dsRNA 递送效率	[27]
6	壳聚糖(CS)	延长 dsRNA 作用时间, 为大豆提供长效保护	[20]
7	碳量子点(CQD)、壳聚糖/SPC 复合物(CSC)	dsRNA 负载能力及稳定性都大幅提升	[45]
8	脂质体	包裹 dsRNA, 将 dsRNA 对番茄和葡萄果实的保护时间延长至 10 d	[46]
9	壳聚糖修饰的单壁碳纳米管	保护核酸免受核酸酶降解	[47]
10	仿生纳米囊泡(细胞膜和阳离子固醇)	克服 dsRNA 在致病疫霉中的吸收屏障	[48]

### 2.1 增强对 dsRNA 的保护作用

在土壤和有水的环境中, dsRNA 可能会在 48 h 内完全降解。核酸酶、雨水、紫外线以及微生物等环境因素都直接影响 dsRNA 的稳定性<sup>[49]</sup>。例如, *ZmFd3*-dsRNA 被阳离子/阴离子脂质体(CLPs 和 ALPs)包裹后, 能够有效促进 dsRNA 在玉米植株中的传递。在外源核酸酶处理下, 脂质体有效保护了 dsRNA 不被降解, 并且能够减缓由玉米褪绿斑驳病毒(Maize Chlorotic Mottle Virus, MCMV)与甘蔗花叶病毒(Sugarcane Mosaic Virus, SCMV)共同侵染引起的玉米致死性坏死<sup>[44]</sup>。此外, 一种新型的纳米递送系统采用了细胞穿梭肽(CPP)修饰的自组装形成的四面体 DNA 框架结构(TDN)作为核心, 外壳由聚多巴胺杂化介孔二氧化硅纳米颗粒(PDA-MSN)构成。该系统能够延缓 siRNA 的降解, 并且在酸性条件下智能响应药物释放, 从而显著提高 siRNA 的利用效率<sup>[50]</sup>。同时, 功能化碳量子点(CDs)被证明能够有效保护 siRNA 免受核酸酶的降解。在与 RNase-III 孵育 1 h 后, siRNA 的降解程度最小<sup>[51]</sup>。

### 2.2 提高 dsRNA 递送效率

真菌细胞膜具有选择通透性, 通常情况下, 长链的 dsRNA 分子较大, 不易通过真菌的细胞膜进入细胞内部。因此, 病原菌对 dsRNA 的吸收效率成为 RNAi 技术有效性的关键限制因素之一, 直接影响该技术的应用效果。为解决 dsRNA 的递送瓶颈, 可采用多种纳米材料来提升病原菌的吸收效率。例如, 星形多聚阳离子聚合物(SPC)与 dsRNA 络合后施用, 显著提高了 *Phytophthora infestans* 对 dsRNA 的吸收效率, 进而增强了 dsRNA 对马铃薯晚疫病的防控效率<sup>[27]</sup>。此外, 功能化碳量子点(CDs)通过静电相互作用与筛选的 dsRNA 络合, 显著提高了 *Phytophthora infestans* 和 *Phytophthora sojae* 对 dsRNA 的吸收能力, 从而提升了 dsRNA 对疫霉病的防治效果<sup>[29]</sup>。另外, 采用冻融法制备的仿生纳米囊泡(ECNs), 通过从番茄叶细胞膜和阳离子固醇体组装而成, 展现了对 dsRNA 的高负载能力和保护性能, 成功克服了致病疫霉对 dsRNA 的吸收屏障<sup>[48]</sup>。

### 2.3 延长 dsRNA 对作物的保护时间

纳米材料可以有效隔绝外界环境对 dsRNA 的影响, 特别是采用包裹方式获得的纳米载体核酸杀菌剂。在植物体内, sRNAs 可能通过胞间连丝从一个细胞转移到另一个细胞, 并通过脉管系统运输<sup>[52]</sup>。Cai 等<sup>[53]</sup>发现拟南芥细胞会分泌外泌体样细胞外囊泡, 将 sRNAs 传递到真菌

病原体葡萄孢菌中。这些含有 sRNA 的囊泡积聚在感染部位,并被真菌细胞吸收,转移的宿主 sRNAs 诱导真菌致病性关键基因的沉默。为了提高 dsRNA 的利用效率,该团队在此研究的基础上,采用了 DOTAP + PEG、DOTAP 和 DODMA 3 种不同的阳离子脂质配方合成人工纳米囊泡,用于包封 dsRNA。这种包封方式有效防止了核酸酶和雨水冲刷对 dsRNA 的影响,并且无论是在果实收获前还是收获后使用纳米囊泡,都能够显著延长 dsRNA 的作用时间<sup>[46]</sup>。此外,将低成本的星形阳离子(SPc)纳米载体与 dsRNA 络合后,形成的复合物在植物叶片上停留时间可长达 12 d,进而显著提高了植物的抗病性<sup>[27]</sup>。

## 2.4 减少化学杀菌剂的使用

在保证对农作物防效的前提下,减少传统化学杀菌剂的使用,一直是农业研究的热点问题。将聚乙二醇二胺(PEGDA)功能化的碳量子点纳米颗粒(CDs)通过静电相互作用与靶向疫霉菌保守的羧酸酰胺类(CAAs)杀菌剂靶标蛋白—纤维素合酶 3(CesA3)和氟噻唑吡乙酮的靶标氧化固醇结合蛋白 1(OSBP1)的 dsRNA 络合,dsRNA-CDs 显著增强了 dsRNA 对辣椒疫霉菌的防治效果;与化学杀菌剂联合使用时,即便将化学杀菌剂使用量减少 90%,依然能达到相同防治效果;该结果表明,dsRNA-CDs 纳米载体不仅在作物疫病防治方面表现出色,同时对于化学农药的减量增效具有重要意义<sup>[29]</sup>。此外,施用方法上还可以选择 dsRNA 杀菌剂和化学农药共同使用。这种组合不仅能保证防控效果,还能显著减少化学农药的使用量,从而更好地解决农业生产中的实际问题<sup>[54]</sup>。相关研究表明,基于纳米载体的 dsRNA 杀菌剂在病害防治中的防效与市售化学农药效果相当,甚至在某些情况下,效果更为优越<sup>[27]</sup>。

## 3 总结与展望

全球首款喷洒型 RNA 生物农药 Ledprona(商品名 Calantha)于 2023 年在美国获得批准,这标志着世界上首个允许商业使用的可喷雾 dsRNA 农药正式投入市场,目前已获美国国家环境保护署批准登记,这对 RNA 农药的行业发展具有重要意义。我国在推动农业可持续发展方面也积极布局,已明确提出要优先发展 RNA 生物农药,表明对该技术的高度重视。2024 年 4 月,中国农药工业协会发布了全球首个 RNA 农药标准——《烟草花叶病毒衣壳蛋白核酸干扰素母药》团体标准,为行业提供了科学、规范的研发与生产标准。这些进展不仅加速了 dsRNA 杀菌剂研究成果的转化、商业化和产业化,还为我国在 RNA 农药领域实现技术突破与产业领先创造了重要契机。

靶标基因的选择是 dsRNA 杀菌剂有效性的关键。对于 RNA 生物农药靶标基因选择,可以将已知病原菌的关键生长、发育或致病基因作为靶标进行筛选;同时,还可以利用大数据技术建立有害生物 RNAi 靶标基因的智能筛选系统。开发广谱性农药的同时,避免对非靶标生物的伤害一直是研究的目标。人们希望通过使用单一农药实现对多种有害生物的防控。未来,dsRNA 生物农药将朝着广谱防治的方向发展,即能够针对多个靶点进行设计,而不再局限于单一有害生物,从而提升农药的应用效果。dsRNA 杀菌剂具有较强的靶标基因替代性,可以有效解决有害生物抗药性的问题。

基于纳米载体的递送系统已被证实能有效提高 dsRNA 的递送效率,并为其提供保护屏障。纳米材料作为递送载体的生物安全性问题一直备受关注,主要涉及纳米材料的降解、在环境中的扩散风险以及对非靶标生物的毒性等。开发与 dsRNA 生物相容性高的纳米载体,既能

提高核酸的稳定性,又能确保其顺利递送至有害生物体内,这是实现有效防控的关键。因此,低成本、绿色环保且多功能的纳米载体具有广阔应用前景。

植物叶片表面有蜡质层、绒毛等结构,展现出一定的疏水性,因此,农药液滴在植物叶片上的低接触角和高滞留是提高其利用效率的关键<sup>[55]</sup>。dsRNA 杀菌剂的助剂开发具有较高挑战性。如果在纳米材料表面引入羧基、氨基等基团进行修饰,或通过改变纳米材料表面电位、利用静电吸附作用等方式增强 dsRNA 杀菌剂在叶片上的附着力和接触面积,就能进一步提高核酸的利用效率。使纳米材料兼具递送和助剂功能,不仅有助于降低成本,还有助于提高效果。

商业化 dsRNA 合成试剂盒的成本较高,但随着合成生物学技术的飞速发展,通过改造工程菌株,在保证活性成分的同时实现了 dsRNA 的量产,从而显著降低了 RNA 生物农药的生产成本<sup>[56-57]</sup>。随着研究的不断深入,基于纳米载体的 dsRNA 杀菌剂的生产工艺将更加成熟,核酸的低成本规模化生产和纯化工艺将得到进一步完善,相关的生产标准和质量控制体系也将逐步建立,评估和监管体系将更为健全。随着法律法规的不断完善和公众意识的提升,基于纳米载体的 dsRNA 杀菌剂将在全球市场获得更广泛的接受度,将成为未来农业中一种重要的植物病害防治手段。因此,这种基于纳米载体的 dsRNA 杀菌剂凭借其在农业病害防控、食品安全保障和农业绿色可持续发展方面展出多重优势,将成为最具产业化前景的新型生物防治技术之一。

#### 参考文献:

- [1] VERMA K, MODGIL M. RNA Interference (RNAi) Mediated Technique for Combating Plant Diseases: Harnessing Nanoparticles for Effective Delivery and Enhanced Efficacy[J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 2024, 157(3): 53.
- [2] 高沥文,陈世国,张裕,等. 基于 RNA 干扰的生物农药的发展现状与展望[J]. *中国生物防治学报*, 2022, 38(3): 700-715.
- [3] KOCH A, KUMAR N, WEBER L, et al. Host-Induced Gene Silencing of Cytochrome P450 Lanosterol C14 $\alpha$ -Demethylase-Encoding Genes Confers Strong Resistance to *Fusarium* Species[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, 110(48): 19324-19329.
- [4] MAO Y B, CAI W J, WANG J W, et al. Silencing a Cotton Bollworm P450 Monooxygenase Gene by Plant-Mediated RNAi Impairs Larval Tolerance of Gossypol[J]. *Nature Biotechnology*, 2007, 25(11): 1307-1313.
- [5] ZHANG H, LI H C, MIAO X X. Feasibility, Limitation and Possible Solutions of RNAi-Based Technology for Insect Pest Control[J]. *Insect Science*, 2013, 20(1): 15-30.
- [6] 关梅,晁子健,闫硕,等. RNA 农药的研究现状和发展前景[J]. *现代农药*, 2023, 22(2): 11-18.
- [7] FIRE A, XU S, MONTGOMERY M K, et al. Potent and Specific Genetic Interference by Double-Stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*[J]. *Nature*, 1998, 391(6669): 806-811.
- [8] GELEY S, MÜLLER C. RNAi: Ancient Mechanism with a Promising Future[J]. *Experimental Gerontology*, 2004, 39(7): 985-998.
- [9] HABIG J W, ARUSCAVAGE P J, BASS B L. In *C. Elegans*, High Levels of dsRNA Allow RNAi in the Absence of RDE-4[J]. *PLoS One*, 2008, 3(12): e4052.
- [10] NOWARA D, GAY A, LACOMME C, et al. HIGS: Host-Induced Gene Silencing in the Obligate Biotrophic Fungal Pathogen *Blumeria graminis*[J]. *The Plant Cell*, 2010, 22(9): 3130-3141.
- [11] ZHANG T, JIN Y, ZHAO J H, et al. Host-Induced Gene Silencing of the Target Gene in Fungal Cells Confers Effective Resistance to the Cotton Wilt Disease Pathogen *Verticillium dahliae* [J]. *Molecular Plant*, 2016, 9(6): 939-942.



- [12] WANG M, JIN H L. Spray-Induced Gene Silencing: A Powerful Innovative Strategy for Crop Protection[J]. Trends in Microbiology, 2017, 25(1): 4-6.
- [13] KOCH A, BIEDENKOPF D, FURCH A, et al. An RNAi-Based Control of *Fusarium graminearum* Infections through Spraying of Long dsRNAs Involves a Plant Passage and Is Controlled by the Fungal Silencing Machinery [J]. PLoS Pathogens, 2016, 12(10): e1005901.
- [14] GU K X, SONG X S, XIAO X M, et al. A  $\beta$ 2-Tubulin dsRNA Derived from *Fusarium asiaticum* Confers Plant Resistance to Multiple Phytopathogens and Reduces Fungicide Resistance[J]. Pesticide Biochemistry and Physiology, 2019, 153: 36-46.
- [15] OUYANG S Q, JI H M, FENG T, et al. Artificial Trans-Kingdom RNAi of *FolRDR1* Is a Potential Strategy to Control Tomato Wilt Disease[J]. PLoS Pathogens, 2023, 19(6): e1011463.
- [16] WERNER B T, GAFFAR F Y, SCHUEMANN J, et al. RNA-Spray-Mediated Silencing of *Fusarium graminearum* AGO and DCL Genes Improve Barley Disease Resistance[J]. Frontiers in Plant Science, 2020, 11: 476.
- [17] WANG M, WEIBERG A, LIN F M, et al. Bidirectional Cross-Kingdom RNAi and Fungal Uptake of External RNAs Confer Plant Protection[J]. Nature Plants, 2016, 2: 16151.
- [18] SARKAR A, ROY-BARMAN S. Spray-Induced Silencing of Pathogenicity Gene *MoDES1* via Exogenous Double-Stranded RNA Can Confer Partial Resistance Against Fungal Blast in Rice[J]. Frontiers in Plant Science, 2021, 12: 733129.
- [19] HU D F, CHEN Z Y, ZHANG C Q, et al. Reduction of *Phakopsora pachyrhizi* Infection on Soybean through Host- and Spray-Induced Gene Silencing[J]. Molecular Plant Pathology, 2020, 21(6): 794-807.
- [20] OUYANG H, SUN G, LI K, et al. Profiling of *Phakopsora pachyrhizi* Transcriptome Revealed Co-Expressed Virulence Effectors as Prospective RNA Interference Targets for Soybean Rust Management[J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2024, 66(11): 2543-2560.
- [21] DEGNAN R M, SHUEY L S, RADFORD-SMITH J, et al. Double-Stranded RNA Prevents and Cures Infection by Rust Fungi[J]. Communications Biology, 2023, 6(1): 1234.
- [22] ZHAO M, WANG C, WAN J, et al. Functional Validation of Pathogenicity Genes in Rice Sheath Blight Pathogen *Rhizoctonia solani* by a Novel Host-Induced Gene Silencing System[J]. Molecular Plant Pathology, 2021, 22(12): 1587-1598.
- [23] WANG Y, GUO Y, GUO S P, et al. RNA Interference-Based Exogenous Double-Stranded RNAs Confer Resistance to *Rhizoctonia solani* AG-3 on *Nicotiana tabacum*[J]. Pest Management Science, 2024, 80(4): 2170-2178.
- [24] MCLOUGHLIN A G, WYTINCK N, WALKER P L, et al. Identification and Application of Exogenous dsRNA Confers Plant Protection Against *Sclerotinia sclerotiorum* and *Botrytis cinerea* [J]. Scientific Reports, 2018, 8(1): 7320.
- [25] QIAO L L, LAN C, CAPRIOTTI L, et al. Spray-Induced Gene Silencing for Disease Control Is Dependent on the Efficiency of Pathogen RNA Uptake[J]. Plant Biotechnology Journal, 2021, 19(9): 1756-1768.
- [26] BHAGTA S, BHARDWAJ V, KANT A. Exogenous dsRNA Trigger RNAi in *Venturia inaequalis* Resulting in down Regulation of Target Genes and Growth Reduction[J]. Molecular Biology Reports, 2023, 50(10): 8421-8429.
- [27] WANG Y X, LI M S, YING J H, et al. High-Efficiency Green Management of Potato Late Blight by a Self-Assembled Multicomponent Nano-Bioprotectant[J]. Nature Communications, 2023, 14(1): 5622.
- [28] SHARMA S, BAIRWA A, TOMAR M, et al. Spraying of dsRNA Molecules Derived from *Phytophthora infestans*, along with Nanoclay Carriers as a Proof of Concept for Developing Novel Protection Strategy for Potato

- Late Blight[J]. *Pest Management Science*, 2022, 78(7): 3183-3192.
- [29] WANG Z W, LI Y, ZHANG B R, et al. Functionalized Carbon Dot-Delivered RNA Nano Fungicides as Superior Tools to Control *Phytophthora* Pathogens through Plant RdRP1 Mediated Spray-Induced Gene Silencing[J]. *Advanced Functional Materials*, 2023, 33(22): 2213143.
- [30] TENLLADO F, MARTÍNEZ-GARCÍA B, VARGAS M, et al. Crude Extracts of Bacterially Expressed dsRNA Can Be Used to Protect Plants Against Virus Infections[J]. *BMC Biotechnology*, 2003, 3: 3.
- [31] WORRALL E A, BRAVO-CAZAR A, NILON A T, et al. Exogenous Application of RNAi-Inducing Double-Stranded RNA Inhibits Aphid-Mediated Transmission of a Plant Virus[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2019, 10: 265.
- [32] XU X, YU T T, ZHANG D S, et al. Evaluation of the Anti-Viral Efficacy of Three Different dsRNA Nanoparticles Against Potato Virus Y Using Various Delivery Methods[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2023, 255: 114775.
- [33] XU X, JIAO Y B, SHEN L L et al. Nanoparticle-dsRNA Treatment of Pollen and Root Systems of Diseased Plants Effectively Reduces the Rate of Tobacco Mosaic Virus in Contemporary Seeds[J]. *ACS Applied Materials And Interfaces*, 2023, 15(24): 29052-29063.
- [34] 徐翔, 解屹, 宋丽云, 等. 高效靶向降解烟草花叶病毒核酸的 dsRNA 筛选与大量制备[J]. *中国农业科学*, 2021, 54(6): 1143-1153.
- [35] 郭玉婷, 葛广路. 纳米材料的欧盟定义及安全性评估[J]. *中国个体防护装备*, 2012(2): 41-45.
- [36] GRILLO R, ROSA A H, FRACETO L F. Poly ( $\epsilon$ -Caprolactone) Nanocapsules Carrying the Herbicide Atrazine: Effect of Chitosan-Coating Agent on Physico-Chemical Stability and Herbicide Release Profile[J]. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 2014, 11(6): 1691-1700.
- [37] YE Z, GUO J Q, WU D W, et al. Photo-Responsive Shell Cross-Linked Micelles Based on Carboxymethyl Chitosan and Their Application in Controlled Release of Pesticide[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2015, 132: 520-528.
- [38] KAZIEM A E, YANG L P, LIN Y G, et al. Pest Invasion-Responsive Hollow Mesoporous Silica-Linked Carboxymethyl Starch Nanoparticles for Smart Abamectin Delivery[J]. *ACS Applied Nano Materials*, 2022, 5(3): 3458-3469.
- [39] YU M L, SUN C J, XUE Y M, et al. Tannic Acid-Based Nanopesticides Coating with Highly Improved Foliage Adhesion to Enhance Foliar Retention[J]. *RSC Advances*, 2019, 9(46): 27096-27104.
- [40] LIANG W L, CHENG J L, ZHANG J D, et al. PH-Responsive On-Demand Alkaloids Release from Core-Shell ZnO@ZIF-8 Nanosphere for Synergistic Control of Bacterial Wilt Disease[J]. *ACS Nano*, 2022, 16(2): 2762-2773.
- [41] MONTASER A S, ABDELHAMEED R M, SHAHEEN T I. Formulating of the Sustained Release of Tebuconazole Pesticide Using Chitosan Aerogel Reinforced NFC/CaCO<sub>3</sub> Nanocomposite[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2024, 256: 128419.
- [42] 闫硕, 蒋沁宏, 沈杰. 纳米农药及载体材料的增效机理研究现状[J]. *植物保护学报*, 2022, 49(1): 366-373.
- [43] MITTER N, WORRALL E A, ROBINSON K E, et al. Clay Nanosheets for Topical Delivery of RNAi for Sustained Protection Against Plant Viruses[J]. *Nature Plants*, 2017, 3: 16207.
- [44] HAO K Q, GAO X R, YANG M R, et al. A Nanomaterial for the Delivery of dsRNA as a Strategy to Alleviate Viral Infections in Maize[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2024, 488: 150923.
- [45] WANG Y M, YAN Q, LAN C, et al. Nanoparticle Carriers Enhance RNA Stability and Uptake Efficiency and Prolong the Protection Against *Rhizoctonia solani*[J]. *Phytopathology Research*, 2023, 5(1): 2.
- [46] QIAO L L, NIÑO-SÁNCHEZ J, HAMBY R, et al. Artificial Nanovesicles for dsRNA Delivery in Spray Induced Gene Silencing for Crop Protection[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2023, 21(4): 854-865.

- [47] KWAK S Y, LEW T T S, SWEENEY C J, et al. Chloroplast-Selective Gene Delivery and Expression in Planta Using Chitosan-Complexed Single-Walled Carbon Nanotube Carriers[J]. *Nature Nanotechnology*, 2019, 14(5): 447-455.
- [48] ZHANG Z, LUO H Y, ZHANG X Y, et al. Extracellular Vesicles Mimetic Design of Membrane Chimeric Nanovesicles for dsRNA Delivery in Spray-Induced Gene Silencing for Crop Protection[J]. *ACS Nano*, 2024, 18(47): 32468-32480.
- [49] RANK A P, KOCH A. Lab-to-Field Transition of RNA Spray Applications - How Far Are We? [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2021, 12: 755203.
- [50] DING C Y, JIAO Y B, LI Y, et al. A Novel PH-Responsive Multi-Component Nanodelivery System with siRNA for Plant Disease Management[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2024, 497: 155001.
- [51] SCHWARTZ S H, HENDRIX B, HOFFER P, et al. Carbon Dots for Efficient Small Interfering RNA Delivery and Gene Silencing in Plants[J]. *Plant Physiol*, 2020, 184(2): 647-657.
- [52] MOLNAR A, MELNYK C W, BASSETT A, et al. Small Silencing RNAs in Plants Are Mobile and Direct Epigenetic Modification in Recipient Cells[J]. *Science*, 2010, 328(5980): 872-875.
- [53] CAI Q, QIAO L L, WANG M, et al. Plants Send Small RNAs in Extracellular Vesicles to Fungal Pathogen to Silence Virulence Genes[J]. *Science*, 2018, 360(6393): 1126-1129.
- [54] YU C, LI J Q, ZHANG Z Y, et al. Metal-Organic Framework-Based Insecticide and dsRNA Codelivery System for Insecticide Resistance Management[J]. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 2023, 15(41): 48495-48505.
- [55] YIN J, ZHAO J, WANG Z, et al. Preparation of Multifunctional Nano-Protectants for High-Efficiency Green Control of Anthracnose[J]. *Advanced Science*, 2024, 11(48): e2410585.
- [56] MA Z Z, ZHOU H, WEI Y L, et al. A Novel Plasmid-Escherichia Coli System Produces Large Batch dsRNAs for Insect Gene Silencing[J]. *Pest Management Science*, 2020, 76(7): 2505-2512.
- [57] GUAN R B, CHU D D, HAN X Y, et al. Advances in the Development of Microbial Double-Stranded RNA Production Systems for Application of RNA Interference in Agricultural Pest Control[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2021, 9: 753790.

责任编辑 苏荣艳