

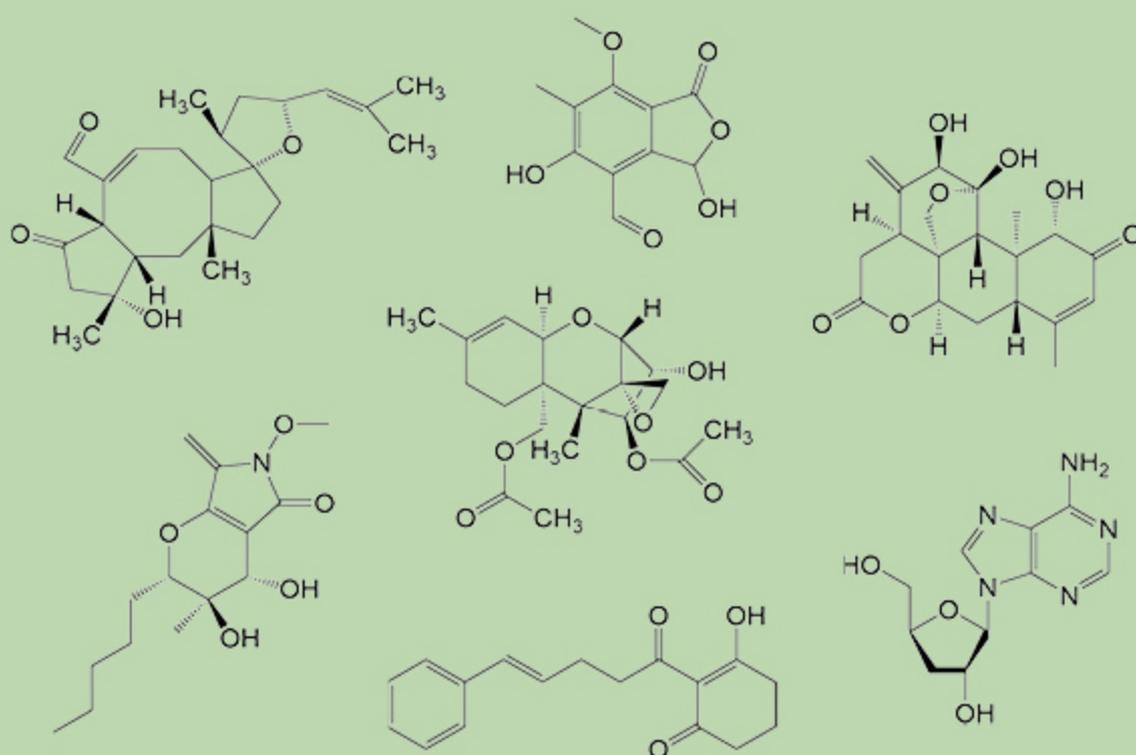


ISSN 1727-1320 (Print),
ISSN 2308-6459 (Online)

ВЕСТНИК ЗАЩИТЫ РАСТЕНИЙ

PLANT PROTECTION NEWS

2023 TOM 106 ВЫПУСК 1
VOLUME ISSUE



Санкт-Петербург
St. Petersburg, Russia

РНК-ИНТЕРФЕРЕНЦИЯ В ИЗУЧЕНИИ ФУНКЦИЙ ГЕНОВ У ТЛЕЙ И ДРУГИХ ПОЛУЖЕСТКОКРЫЛЫХ И БОРЬБЕ С ИХ ВРЕДНЫМИ ПРЕДСТАВИТЕЛЯМИ

А.В. Конарев

Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений, Санкт-Петербург

e-mail: alv-konarev@yandex.ru

РНК-интерференция (РНКи) – важный механизм, обеспечивающий защиту клеток эукариотических организмов от чужеродной генетической информации и регуляцию физиологических процессов в них. Раскрытие природы РНКи и создание методов целенаправленного подавления экспрессии отдельных генов открыли широкие возможности для выяснения функций генов и решения многих проблем биологии, медицины и защиты растений. Данный подход может способствовать разработке новых эффективных, высокоспецифичных и безопасных для человека и среды способов борьбы с вредными насекомыми. Уже известны отдельные примеры практического использования РНКи в технологиях борьбы с грызущими вредителями. В силу особенностей биологии, характера питания, а также путей доставки генетических конструкций в организм, РНКи у насекомых с колюще-сосущим ротовым аппаратом – тлей, клопов и другие полужесткокрылых – заслуживает отдельного рассмотрения. В обзоре обсуждаются критерии выбора целевых генов и решаемые посредством РНКи вопросы их функциональной активности, способы доставки двухцепочечных и малых РНК в организмы различных Hemiptera, нецелевое действие РНКи и пути его предотвращения. Также показаны возможности практического применения данного подхода в отношении полужесткокрылых вредителей сельскохозяйственных растений и переносчиков опасных заболеваний человека и животных.

Ключевые слова: Hemiptera, полужесткокрылые, тли, рнк-интерференция, сайленсинг гена, вредители, защита растений, переносчики заболеваний

Поступила в редакцию: 23.01.2023

Принята к печати: 23.03.2023

1. Введение

Современное сельское хозяйство остро нуждается в эффективных, высокоспецифичных и безопасных для человека и среды способах борьбы с вредными насекомыми. В основе одного из таких перспективных подходов лежит использование РНК-интерференции (РНКи) – природного механизма, позволяющего избирательно подавлять экспрессию определенных генов вредного организма с помощью коротких фрагментов РНК, что приводит к нарушению его развития или гибели. РНКи представляет собой высококонсервативный посттранскрипционный механизм подавления активности генов, в котором малые молекулы РНК используются комплексом специализированных ферментов клетки для специфичного разрушения комплементарной мРНК. В результате синтез соответствующего белка прекращается (Fire et al., 1998). В эукариотических клетках эволюционно древний механизм РНКи служит для регуляции генов и защиты от вирусов и транспозонов (Mehlhorn et al., 2021). Данный механизм может быть использован в экспериментах для изучения функций генов, а также на практике в медицине и сельском хозяйстве для подавления нежелательной активности генов, в том числе, для уничтожения патогенов или вредителей за счет введения в организм соответствующей двухцепочечной (дц) или короткой (малой) интерферирующей РНК (siRNA) (Saurabh et al., 2014; Mamta, Rajam, 2017; Tandon et al., 2021). Отметим, что в зарубежной литературе, в том

числе, приведенной выше, термином дцРНК (dsRNA), как правило, обозначают длинные (в несколько десятков или сотен нуклеотидов) непроцессированные фрагменты двухцепочечной РНК, а «короткая РНК» – фрагменты двухцепочечной РНК длиной 20–25 нуклеотидов, возникшие в результате процессинга дцРНК перед РНКи, или искусственно синтезированные.

В отличие от химических инсектицидов и трансгенных растений, продуцирующих токсины *Bacillus thuringiensis* (Bt), подход, основанный на РНКи, может быть направлен на конкретного насекомого-вредителя, не затрагивая нецелевые организмы. Теоретически любые гены, необходимые для выживания, роста, развития, размножения или питания вредного насекомого, могут служить мишенями для РНКи (Li et al., 2015). Тонкие механизмы посттранскрипционного сайленсинга генов, в частности, у насекомых, детально описаны в многочисленных обзорах (Максимов и др. 2021; Журавлев и др., 2022; Cooper et al., 2019; Vogel et al., 2019; Silver et al., 2021) и в данной работе они рассматриваться не будут.

Широкое внедрение методов борьбы с вредителями на основе РНКи во многом сдерживается зачастую весьма разнородными результатами исследований, включающих разные виды насекомых, стадии их развития, ткани и гены. Виды насекомых существенно различаются по чувствительности к дцРНК. Выяснилось, что эффективность

РНКи может значительно снижаться за счет активности рибонуклеаз (дцРНКаз), разрушающих РНК, эндосомального захвата, особенностей функционирования основного ферментативного механизма обработки дцРНК в клетках насекомого, а также неадекватной иммунной стимуляции (Cooper et al., 2019).

Значительная часть исследований по РНКи была посвящена жесткокрылым и другим вредителям с грызущим ротовым аппаратом. В свою очередь насекомые с колюще-сосущим ротовым аппаратом – тли и другие полужесткокрылые заслуживают отдельного рассмотрения в связи с вопросами РНКи ввиду особенностей их биологии, характера питания, а также путей доставки дц и коротких РНК в их организм (Andrade, Hunter, 2016). По данным Jain et al. (2021), РНКи исследовалась приблизительно у 38 видов Hemiptera, принадлежащих к 14 семействам. В большинстве случаев сообщалось об эффектах РНКи, выразившихся в повышенной смертности насекомых, затруднении переноса ими фитопатогенных вирусов и бактерий или болезнетворных для человека и животных простейших, а также в снижении устойчивости к инсектицидам.

Тли – мелкие насекомые с колюще-сосущим ротовым аппаратом, питающиеся соками растений. Из примерно 4000 известных видов тлей от 100 до 250 являются опасными вредителями сельскохозяйственных растений (Dedryver et al., 2010; Nalam et al., 2018). Потребляя большое количество флоэмного сока, они лишают растение фотосинтезатов, вводят в растение фитотоксичные секреты слюнных желез, участвуют в распространении вирусных болезней (Радченко, 2017; Nalam et al., 2018; Ray, Casteel, 2022). Важно отметить, что косвенный ущерб, наносимый тлями путем передачи вируса, нередко существенно превышает вред от их прямого воздействия на сельскохозяйственные культуры. Примерно половина из известных 600

фитопатогенных вирусов переносятся тлями, а выделяемая ими медвяная падь служит хорошей средой для развития плесневых грибов, ограничивающих фотосинтетическую активность (Dedryver et al., 2010). Ряд видов тлей служит моделью при изучении физиологической и молекулярной природы эндосимбиоза (Baumann et al., 2013; Oliver et al., 2010; Manzano-Mariñ et al., 2020; Ergin et al., 2022).

Тли представлены несколькими тысячами видов крупного надсемейства Aphidoidea, входящего в подотряд грудохоботных (Sternorrhyncha) отряда полужесткокрылых Hemiptera наряду с представителями надсемейств Aleyrodoidea (белокрыльковые), Psylloidea (листочковидные), Coccoidea (червецы и щитовки), Adelgoidea (хермесы) и Phylloxeroidea (филлоксеры) (Синев, 2013; Forego, 2008). Классификация группы еще до конца не устоялась, существуют и другие ее варианты с небольшими отличиями (Sorensen et al., 2009; Zyla et al., 2017). По данным анализа митохондриальных геномов Sternorrhyncha являются сестринской группой по отношению к остальным Hemiptera (Song et al., 2019), включая подотряды Heteroptera (клопы), Auchenorrhyncha (цикадовые) и Coleorrhyncha. Знание эволюционных связей тлей с близкими таксонами может облегчить обобщение и более эффективное использование накопленных сведений по разработке новых эффективных подходов к борьбе с данными вредителями, включая РНКи.

Задача настоящего обзора – систематизировать имеющиеся представления относительно эффективности методов РНКи при изучении различных аспектов биологии тлей и других полужесткокрылых, а также оценить возможности практического применения РНКи для борьбы с их вредными представителями, в первую очередь, в области защиты растений.

2. Особенности проведения экспериментов по РНКи на тлях и других Hemiptera

РНКи, показавшая свою эффективность на ряде видов насекомых с грызущим ротовым аппаратом, считается перспективным подходом и к изучению функций генов у полужесткокрылых, а также к борьбе с их представителями, наносящими вред сельскохозяйственным растениям или здоровью человека и животных. Однако при разработке соответствующих подходов к Hemiptera необходимо учитывать существенные особенности их пищеварительной системы, в которой, помимо кишечника, важную роль играют слюнные железы. Питание тлей и многих других полужесткокрылых связано исключительно с флоэмой, что существенным образом отражается на их физиологии, включая секрецию в растение продуцируемых слюнными железами эффекторных белков и ферментов, облегчающих доступ к пище, оптимизирующих ее состав и питательные свойства, а также нейтрализующих защитные реакции растения (McAllan, Adams, 1961; Nalam et al., 2018; Ahman et al., 2019; Liu et al., 2020; Silva-Sanzana et al., 2020; Zhang et al., 2022c). Ферменты и другие белки слюнных желез клопов способствуют, например, усвоению нерастворимых в воде запасных белков и углеводов семян растений (Конарев et al., 2019) или питание кровью человека и животных (Paim et al., 2017). Многие из генов, вовлеченных в данные процессы, могут послужить эффективными мишенями для сайленсинга, обусловленного РНКи.

Кроме того, для тлей характерны сложные жизненные циклы, включающие чередование первичных и вторичных хозяев (Sorensen, 2009). Они могут размножаться половым или однополым путем, быть крылатыми или бескрылыми. Посевы заселяются крылатыми тлями, которые партеногенетически дают последовательные однополые поколения посредством живорождения (Davis et al., 2012; Ahman et al., 2019). Особенности биологии тлей способствуют возможности проявления долговременных и трансгенерационных последствий экспериментальной РНКи (Jain et al., 2021). Многочисленные клоны родительской особи с идентичными геномами живут колониями и при адекватном качестве пищи и отсутствии неблагоприятных факторов ведут оседлый образ жизни, благодаря, в том числе, также и тому, что в ходе эволюции тли приобрели способность изменять метаболизм растений-хозяев в свою пользу (Zust, Agrawal, 2016; Yates, Michel, 2018; Yates-Stewart et al., 2020). Многие черты биологии тлей характерны и для ряда других растительноядных Hemiptera – питание флоэмным соком, обладающим ограниченной питательной ценностью, что обуславливает зависимость от эндосимбионтов, а также партеногенез, способность переносить фитопатогенные вирусы и другие (Jain et al., 2020; Kanakala et al., 2019; Semeraro et al., 2021; Shapoval et al., 2021).

3. Выбор генов-мишеней для РНКи

Выбор генов-мишеней для РНКи определяется целями исследования – выяснением функций данных генов или возможности их практического использования в связи с задачами защиты растений или решением вопросов других областей биологии. Часто результаты исследований первого направления служат основой для реализации задач второго. Подбор потенциальных генов-мишеней для РНКи осуществляется на основе данных геномного секвенирования или анализа транскриптомов. Среди тлей впервые ядерный геном был полностью секвенирован у гороховой тли *Acyrtosiphon pisum* Hart. (i5K Consortium, 2013; Li et al., 2019). Полностью или частично секвенированы геномы и других видов тлей (The aphid genome database, <http://www.aphidbase.com/aphidbase/>): соевой (*Aphis glycines* Mats.), ячменной (*Diuraphis noxia* Mord.), яблонно-подорожниковой (*Dysaphis plantaginea* Pass.), кровяной (*Eriosoma lanigerum* Hausm.), хлопковой (*Aphis gossypii* Glover), вишнёвой (*Myzus cerasi* F.), персиковой (*Myzus persicae* Sulz.), банановой (*Pentalonia nigronervosa* Coquerel), кукурузной (*Rhopalosiphum maidis* Fitch) (Chen et al. 2019a) и чермухово-злаковой (*Rhopalosiphum padi* (L.)). Секвенированы геномы и ряда других Hemiptera, например, виноградной филлоксеры *Daktulosphaira vitifoliae* (Fitch) (Rispe et al., 2020) и мраморного клопа *Halyomorpha halys* (Stål) (Pentatomidae) (Sparks et al., 2020).

В свою очередь, данные транскриптомного анализа получены для гороховой тли *A. pisum*, большой злаковой тли *Sitobion avenae* F., цитрусовой тли *Aphis (Toxoptera) citricidus* (Kirkaldy), *M. persicae*, *R. padi*, *A. gossypii*, *Aphis aurantii* Boyer de Fonscolombe (NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra>), клопа *H. halys* (Sparks et al., 2014).

В многочисленных экспериментах по РНКи выявлены гены, вовлеченные в те или иные важные процессы в организмах тлей и других Hemiptera, в том числе, в питание на растении (Mutti et al., 2006, 2008; Zhang et al., 2015; Abdellatef et al., 2015), оогенез и эмбриогенез (Shang et al., 2018); генезис половых клеток (Gao et al., 2021), пищевое поведение (Li et al., 2018), реакции на аттрактанты и феромоны (Fan et al., 2015; Sun, Li, 2018), синтез феромонов (Sun and Li, 2021), формирование устойчивости к инсектицидам (Gong et al., 2014; Xiao et al., 2014; He et al., 2019; Chen et al., 2019b; Zhang et al., 2019), подавление защитных реакций растений (Zhang et al., 2022b,c), перенос фитопатогенных вирусов (Tamborindeguay et al., 2013; Kanakala et al., 2019), регуляцию осмотического давления в гемолимфе (Shakesby et al., 2009), сигнальные пути (Ghosh et al., 2017; Ding et al., 2017), формирование кутикулы (Shang et al., 2020), метаболизм липидов и гликогена (Shang et al., 2016), метаболизм хитина и метаморфоз (Ye et al., 2019; Wang et al., 2021), поглощение клетками дцРНК в процессе эндоцитоза (Ye et al., 2021) и т.д. Сайленсинг большинства выявленных генов вызывал серьезные нарушения развития или резко повышал смертность насекомых, что позволило авторам исследований предлагать данные гены в качестве возможных мишеней для борьбы с вредителями. Примеры результатов подавления таких генов будут рассмотрены ниже.

Одним из важных условий пригодности потенциальных генов-мишеней тлей для защиты растений является системный эффект от РНКи, в результате чего

последствия подавления гена проявляются не в отдельной ткани, например в кишечнике, а и в других тканях или во всем организме (Tomoyasu et al., 2008; Yu et al., 2016). Для реализации системной РНКи необходимыми этапами являются поглощение дцРНК клеткой, амплификация и распространение дцРНК в другие клетки с последующей деградацией или блокировкой комплементарной мРНК (Jain et al., 2021). Хотя механизмы системной РНКи у тлей, как и других членистоногих, остаются до конца не выясненными, ее проявления открывают перед исследователями большие возможности (Barnard et al., 2012; Jain et al., 2020). Усиление введенного сигнала при системной РНКи позволяет использовать низкие количества дцРНК для получения ответа во всем организме насекомого. Поскольку подавление экспрессии осуществляется во всех тканях, становится возможным выбор генов для РНКи из всего генома данного насекомого. Это дает преимущество в ситуациях, где выбранный способ введения дцРНК не позволяет доставить ее сразу во все ткани, например, с пищей или путем инъекции (Thakur et al., 2016). Кроме того, становится возможным изучение генов на стадиях жизни, которые недоступны для обычных методов доставки дцРНК, например, на стадии яиц. ДцРНК, введенная в организм взрослой самки тли (Coleman et al., 2014; Abdellatef et al., 2015) или кровососущего клопа (Paim et al., 2013), посредством системной РНКи распространится по всему организму, включая яйцеклетки, и далее ее действие может перейти на последующие стадии или поколения в форме «родительской РНКи» (parental RNAi).

Необходимым условием для начала РНКи является поглощение клетками дцРНК. Молекулярные аспекты этого процесса хорошо изучены у классического объекта для изучения РНКи – нематоды *Caenorhabditis elegans* (*Maupas*) (Feinberg et al., 2003; Winston et al., 2007), но у многих насекомых, включая полужесткокрылых, они пока остаются невыясненными. У насекомых в целом не выявлены гомологи трансмембранного белка нематоды SID-2, вовлеченного в перенос в клетку дцРНК, а гомологи белка SID-1, хотя и найдены у ряда видов насекомых, включая тлей (Cooper et al., 2019; Jain et al., 2021), но не у всех, и они могут выполнять иные функции. Однако все же есть сведения об участии белка SID-1 в усвоении дцРНК клетками ряда Hemiptera (Jain et al., 2021), а также в развитии процесса системной РНКи, инициированного экзогенной дцРНК, например, у бурой рисовой цикадки *Nilaparvata lugens* (Stal.) (Delphacidae) (Xu et al., 2013). Другой механизм поглощения дцРНК у полужесткокрылых насекомых может быть основан на процессе кларитин-зависимого эндоцитоза. По-видимому, он наиболее важен для тех видов, у которых отсутствуют ортологи SID-1 или системная РНКи (Cooper et al., 2019).

Jain et al. (2021), учитывая сложность и множественность метаболических путей у насекомых, включая Hemiptera, полагают, что практическое применение РНКи в сельском хозяйстве может найти лишь в случае одновременного подавления нескольких генов (эффект пирамиды) или параллельного воздействия на разные участки мРНК, кодирующей определенный функционально важный белок. Успешными примерами таких подходов являются подавление двух генов трегалазы у опасного вредителя риса

бурой рисовой цикадки *N. lugens* (Kunieda et al., 2006) и применение специально сконструированной дцРНК, нацеленной на три разных участка гена ацетилхолинэстеразы у капустной моли *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Plutellidae) (Chandra et al., 2019). Негативные для насекомых последствия от таких подходов намного превосходили те, что были получены воздействием на одиночные гены или их отдельные участки.

Большой интерес в связи с РНКи представляют гены тлей и других Hemiptera, полученные от эндосимбиотических микроорганизмов в результате горизонтального переноса (Nikoh, Nakabachi, 2009). Для насекомых, питающихся флоэмой, особенно важны бактерии-эндосимбионты, осуществляющие синтез незаменимых аминокислот и витаминов (Sandstrom, Moran, 1999). Тли вступают в симбиотические отношения с разнообразными наследуемыми бактериями. Следует отметить, что даже само существование и широкое распространение многих насекомых-фитофагов, включая тлей и клопов, стало возможным благодаря симбионтам или заимствованным у них генам, позволяющим безопасно использовать различные растения в пищу (Elston et al., 2022; Moriyama, Fukatsum, 2022). Симбионты тлей представлены как облигатными, так и факультативными микроорганизмами. Помимо поставляющего питательные вещества облигатного симбионта, *Buchnera aphidicola*, тли могут иметь одного или более факультативных симбионтов. Последние обычно не нужны для выживания или размножения тлей, но могут выполнять ряд важных функций, например, защищать от энтомопатогенных грибов или паразитоидных насекомых (Oliver et al., 2010). Генетические системы высших организмов обладают мощными механизмами ограничения экспрессии и функционирования чужеродных генов в своем геноме, однако уже известно множество примеров прорыва подобной обороны, когда переносы генетической информации, в частности, от симбионтов или вирусов, изначально нейтральные, обеспечивали реципиенту несомненные селективные преимущества (Soucy et al., 2015). Так, в геноме кукурузной тли *R. maidis* выявлен ряд горизонтально перенесенных генов – 2 от бактерий, 7 – от грибов, 8 от простейших и 9 от водорослей (Chen et al., 2019). Горизонтально перенесенные гены выявлены и в геномах большой злаковой тли *S. avenae* и других видов тлей (Villarroel et al., 2022), клопов семейства Miridae (Xu et al., 2019b) и

других Hemiptera (Nakabachi et al., 2015; Jockusch, Fisher 2021). Соответственно, подавление экспрессии таких генов у насекомых с помощью РНКи должно приводить к негативным для них последствиям. Например, подавление после микроинъекции дцРНК работы гена *Apns-1*, перенесенного горизонтальным путем в геном гороховой тли от денсовирусов и предположительно кодирующего неструктурный вирусный белок, способный активировать транскрипцию генов, ограничивало появление крылатых форм в ответ на перенаселение (Parker, Brisson, 2019). Это позволило авторам высказать предположение, что данный заимствованный ген участвует в регуляции образования крылатых форм, которые могут легче перемещаться на новые растения-хозяева, хотя и дают меньше потомства.

Внутриклеточные симбионты, обитающие в специализированных клетках – бактериоцитах, также представляют собой потенциальную мишень для РНКи в стратегии борьбы с сосущими вредителями. По мнению Chung et al. (2018), избирательное подавление функции генов, связанных с симбиозом тли, снижает продуктивность вредителя. Эти исследователи добавили в искусственную диету гороховой тли *A. pisum* дцРНК, нацеленные на два связанных с симбиозом и экспрессируемых в бактериоцитах гена тли, *AmiD* и *LdcA1*, кодирующие соответственно амидазу и карбоксипептидазу, способные разрушать пептидогликан – важный компонент бактериальной клеточной стенки. Данные гены были когда-то получены тлей в результате горизонтального переноса от бактерий, в том числе, от видов рода *Rickettsia*, родственных современным *Wolbachia* spp. (Nikoh, Nakabachi, 2009). Теперь эти гены осуществляют защиту обитающего в бактериоцитах эндосимбионта *B. aphidicola* от хозяина, предположительно, путем деградации высвобождаемых симбионтом фрагментов пептидогликана (Chung et al., 2018). Упомянутое воздействие привело к значительному снижению численности и активности *Buchnera* и сопровождалось снижением скорости роста самой тли. Эффект усиливался при параллельном подавлении с помощью РНКи активности гена нуклеазы тли *nuc1*, что защищало дцРНК от неспецифической деградации. Гены *amiD* и *ldcA1* обнаружены в геноме многих видов тлей, а *amiD* еще и у листоблошек. Это указывает на возможность использования данного подхода для специфичного контроля различных вредных Hemiptera, питающихся флоэмным соком (Chung et al., 2021).

4. Примеры подавления транскрипции генов Hemiptera методами РНКи

РНКи показала эффективность в отношении генов, отвечающих за ряд важных функций в организмах многих видов тлей и других Hemiptera, которые могут представлять интерес в качестве мишеней при разработке соответствующих методов защиты растений или борьбы с переносчиками заболеваний человека и животных.

4.1. Тли

РНКи-опосредованное подавление экспрессии гена у тлей было впервые достигнуто путем прямой инъекции дцРНК или малых РНК (siRNA) в гемолимфу. Этот подход был использован для подавления гена *C002*, активно экспрессируемого в слюнных железах гороховой тли (Mutti et al., 2006). Сайленсинг данного гена сопровождался гибелью тлей на растениях, но не на искусственной диете, что

указывало на то, что *C002* вовлечен во взаимодействие тли с растением-хозяином (Mutti et al., 2006, 2008). Микроинъекция длинной дцРНК в гороховую тлю также приводила к подавлению на 30–40% экспрессии генов, кодирующих кальретикулин и катепсин (Jaubert-Possamai et al., 2007). Кальретикулин представляет собой многофункциональный растворимый белок, который вырабатывается в некоторых тканях тли и связывает кальций. В свою очередь отдельные цистеиновые протеазы – катепсины специфически экспрессируются в кишечнике гороховой тли и являются пищеварительными ферментами. Таким образом было показано, что РНКи может быть эффективной в отношении отличающихся по функциям генов, которые экспрессируются в различных тканях тлей (Jaubert-Possamai et al., 2007).

Кормление дцРНК, полученной *in vitro* и включенной в состав искусственной диеты, также может подавлять экспрессию соответствующего гена тли. Питание гороховой тли кормом, содержащим дцРНК, соответствующей транскрипту белка аквапорина, приводило к снижению экспрессии более чем в два раза в течение 24 часов (Shakesby et al., 2009). Поскольку аквапорины вовлечены в осморегуляцию, это приводило к повышению осмотического давления в гемолимфе. В другом исследовании включение в искусственную диету дцРНК, нацеленной на мРНК, кодирующую V-АТФазу, приводило к снижению уровня транскриптов у гороховой тли на 30% и значительному росту её смертности (Whyard et al., 2009).

Для подходов, основанных на РНКи, обусловленной транскрипционными растениями, широко используется зеленая

персиковая тля *M. persicae*. Она способна питаться такими модельными растениями как *Nicotiana benthamiana* Domin и *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., тогда как у гороховой тли *A. pisum* набор кормовых растений намного уже, поскольку она питается только бобовыми (Coleman et al., 2016). РНКи была использована для подавления благоприятствующих тлям генов растений, участвующих в ослаблении защитной реакции растений или облегчающих насекомым доступ к пище и улучшающих ее питательную ценность (Ahman et al., 2019). По мнению авторов, сайленсинг таких генов может быть использован в селекции растений на устойчивость к тлям. Примеры некоторых из многочисленных экспериментов по применению РНКи у тлей и других Hemiptera приведены в Таблице 1.

Таблица 1. Примеры применения РНК-интерференции для выяснения функций генов у тлей и других полужесткокрылых и защиты растений от этих вредителей (по Jain et al., 2020 с дополнениями и изменениями)

Table 1. Examples of application of RNA-interference for elucidation of gene function of aphids and other hemipterans and for plant protection against these pests (after Jain et al., 2020)

Вид	Способ доставки дцРНК/короткой РНК	Целевой ген или контролируемый им белок; этап/путь биосинтеза	Научная проблема, результат исследования или эффект от сайленсинга генов в результате РНКи	Ссылки
<i>Развитие, репродукция и жизнеспособность тлей</i>				
<i>Aphis citricidus</i>	Р	Гены вителлогенина, и его рецептора	Замедление эмбрионального развития и снижение количества новорожденных нимф за счет подавления синтеза вителлогенина	Shang et al., 2018
<i>Acyrtosiphon pisum</i>	Ин	<i>C002</i>	Высокая смертность за счет снижения синтеза в СЖ белка, вовлеченного в питание на растении, но не на ИД	Mutti et al. 2006, 2008
<i>Schizaphis graminum</i>	ИД	<i>SgC002/</i> белок 21.5 кДа	Смертность при питании на пшенице, но не на ИД	Zhang et al., 2015
<i>Aphis citricidus</i>	Р	Гены рецепторов инсулина	Нарушение превращения нимф в имаго	Ding et al., 2017
<i>Aphis citricidus</i>	Р	гены вителлогенина (<i>AcVg</i>) и его рецептора (<i>AcVgR</i>)	Многочисленные нарушения развития	Shang et al., 2018
<i>Aphis citricidus</i>	Р	Гены 3-кетокси-КоА тилолазы и гликоген фосфорилазы	Подавление генов метаболизма липидов и гликогена приводит к недоразвитию крыльев	Shang et al., 2016
<i>A. citricidus</i> , <i>Ac. pisum</i> , <i>M. persicae</i>	Р	Ген белка кутителы 19 <i>CP19</i>	Повышение смертности у тлей, но не у их хищника	Shang et al., 2020
<i>Sitobion avenae</i>	ТГ ячмень	<i>shp</i>	Нарушения питания и развития, снижение выживаемости у нескольких поколений	Abdellatif et al., 2015
<i>Acyrtosiphon pisum</i>	Ин	калретикулин и катепсин	РНКи применима для сайленсинга генов в разных тканях тли	Jaubert-Possamai et al., 2007
<i>Acyrtosiphon pisum</i>	ИД	аквапорин	Подавление экспрессии в кишечнике ведет к повышению осмотического давления в гемолимфе	Shakesby et al., 2009
<i>Acyrtosiphon pisum</i>	ИД	<i>vATPase</i>	Видоспецифичные дцРНК селективно убивают <i>A. pisum</i> и другие виды насекомых	Whyard et al., 2009
<i>Acyrtosiphon pisum</i> <i>Aphis citricidus</i> <i>Myzus persicae</i>	Пн	<i>ApC002</i> , <i>ApCat</i> , <i>ApVhal26</i> , <i>ApVGSC</i> , <i>ApCP19</i> , and <i>ApCHS</i>	Сайленсинг ряда отличающихся по функциям генов привел к гибели насекомых	Niu et al., 2019
<i>Myzus persicae</i>	ИД	<i>Gustavus</i> (<i>MpGus</i>)	Сайленсинг гена, контролирующего генезис половых клеток, вызывает снижение плодовитости	Gao et al., 2021
<i>Sitobion avenae</i>	ИД, ТГ	ген цинкосодержащего белка <i>SaZFP</i>	Снижение плодовитости и выживаемости тлей; трансгенерационный эффект. Перспективный ген-мишень для защиты растений	Sun et al., 2019

Продолжение таблицы 1 // Table 1 continued

Вид	Способ доставки дцРНК/ короткой РНК	Целевой ген или контролируемый им белок; этап/путь биосинтеза	Научная проблема, результат исследования или эффект от сайленсинга генов в результате РНКи	Ссылки
<i>Поведение</i>				
<i>Acyrtosiphon pisum</i>	Ин	Нейропептид F	Уменьшение потребления пищи за счет снижения аппетита	Li et al., 2018
<i>Schizaphis graminum</i>	Пн (Спрей)	<i>Sg2204</i> /эффекторный белок из СЖ	Нарушение пищевого поведения тли; снижение выживаемости и плодовитости, усиление защитных реакций пшеницы	Zhang et al., 2022b
<i>Sitobion avenae</i>	ИД	<i>SaveOrco</i>	Ослабление реакций на аттрактанты и феромоны	Fan et al., 2015
<i>Устойчивость к инсектицидам</i>				
<i>Aphis gossypii</i>	Ин	УДФ-гликозил-тран-сфераза	Снижение устойчивости к имidakлоприду	Chen et al., 2019b
<i>Schizaphis graminum</i>	ИД	<i>MRA, GAT, TLP</i>	то же	Zhang et al., 2019
<i>Aphis gossypii</i>	ИД	Карбоксилэстераза	Снижение устойчивости к органофосфатам	Gong et al., 2014
<i>Sitobion avenae</i>	ТГ	Карбоксилэстераза	Снижение устойчивости к фоксиму	Xu et al., 2014
<i>Rhopalosiphum padi</i> , <i>Sitobion avenae</i>	Ин	Ацетилхолинэстераза 1	Снижение устойчивости к пиримикарбу и малатиону	Xiao et al., 2014
<i>Метаболические и сигнальные пути</i>				
<i>Rhopalosiphum padi</i>	Ин	Гены гликолиза и метаболизма терпеноидов, сигнальный путь инсулина	Феромон тревоги синтезируется в процессе гликолиза и терпеноидного пути под управлением сигнального пути инсулина	Sun, Li., 2021
<i>Aphis gossypii</i>	ИД	<i>Фарнезил-дифосфат</i> синтаза	Выявление взаимосвязей между образованием феромона тревоги и биосинтезом терпеноидов	Sun, Li 2018
<i>Halyomorpha halys</i>	Р	Кислая метилтрансфераза ювенильного гормона (ЖАМТ) и виталлогенин (Vg)	Снижение экспрессии целевых генов	Ghosh et al., 2017
<i>Sitobion avenae</i>	Р	<i>Фактор созревания липазы 2</i>	Снижение выживаемости и репродуктивной способности	Xu et al., 2017
<i>Молекулярные механизмы метаболизма хитина и метаморфоза</i>				
<i>Acyrtosiphon pisum</i>	ИД	Гены <i>трегалозо-6-фосфатсинтазы</i> и <i>трегалазы</i>	Аномальные фенотипы, деформации тела и крыльев после линьки	Wang et al., 2021
<i>A. pisum</i>	Ин Р	Ген хитин-синтазы	Уродства личинок при линьке и снижение плодовитости	Ye et al., 2019
<i>Роль эндоцитоза в поглощении клеткой дцРНК клетками</i>				
<i>Acyrtosiphon pisum</i>	ИД	<i>Arhc</i> и <i>Arvha16</i>	Гены кларитин-зависимого эндоцитоза вовлечены в поглощение дцРНК клетками тлей	Ye et al., 2021
<i>Выбор оптимального пути доставки короткой РНК</i>				
<i>Acyrtosiphon pisum</i> , <i>Aphis glycines</i> , <i>Schizaphis graminum</i>	ПН	<i>tor, bcat</i>	Нанесение в форме аэрозоля с наночастицами повышает эффективность РНКи	Thairu et al., 2017
<i>Перенос вирусов</i>				
<i>Schizaphis graminum</i>		циклофилины	Циклофилины участвуют в переносе тлями вируса желтой карликовости злаков	Tamborindeguy et al., 2013
<i>Bemisia tabaci</i>		<i>CypB</i> и <i>hsp70</i>	Циклофилины и белок теплового шока участвуют в переносе белокрышкой вируса TYLCV на томатах	Kanakala et al., 2019

Р – Листья или черенки, содержащие дцРНК; ТГ – трансгенные растения; Ин – инъекция; ПН – поверхностное (местное) нанесение; ИД – искусственная диета; СЖ – слюнные железы.

Следует отметить, что, несмотря на обилие сообщений об успешном подавлении роста и развития насекомых в экспериментах по РНКи с использованием дцРНК или искусственной микроРНК, пока лишь немногие из этих подходов нашли практическое применение. Особенности физиологии конкретных видов тлей, затрагивающие поглощение РНК-конструкций, их деградацию нуклеазами,

обработку в клетке и системную реакцию, существенным образом влияют на эффективность РНКи и возможность развития резистентности к РНКи в полевых условиях. Очевидно, что следует продолжать поиск перспективных для РНКи генов у основных вредных видов тлей и других Hemiptera, а также повышать специфичность подходов к их подавлению для защиты полезных видов.

4.2. Белокрылки

Белокрылки (Aleyrodidae), подобно тлям, помимо прямого ущерба сельскому хозяйству от питания на растениях, наносят большой урон, индуцируя у многих культур физиологические нарушения, перенося фитопатогенные вирусы, а также вызывая ряд проблем, связанных с выделением медвяной пади и последующим ростом на листьях плесневых грибов (Jain et al., 2021). Широкое применение химических инсектицидов привело к развитию, в частности, у табачной белокрылки *Bemisia tabaci* (Gennadius) резистентности к большинству препаратов (Perier et al., 2022). К настоящему времени накоплено немало примеров, указывающих на перспективность использования РНКи в борьбе с данными вредителями (Grover et al., 2019; Tian et al., 2019; Saurabh et al., 2021). Так, по данным Kanakala et al. (2019), белки *B. tabaci* циклофилин В и белок теплового шока, контролируемые генами *CypB* и *hsp70*, соответственно, взаимодействуют в кишечнике с вирусом желтой курчавости листьев томатов (TYLCV) и играют важную роль в его дальнейшем переносе насекомыми. Подавление этих генов посредством специфичных к ним дцРНК, экспрессируемых в растениях томата, зараженных рекомбинантным табачным вирусом *Tobacco rattle virus* (TRV) с встроенными в него соответствующими генетическими конструкциями, сопровождалось гибелью более 80% особей и нарушением способности переносить вирусы.

He et al. (2019) показали, что сочетание РНКи с инсектицидами может существенно повысить эффективность борьбы с данным вредителем. Так, подавление гена *ABCG3*, контролирующего экспрессию транспортера ABC, белка, вовлеченного в детоксификацию ксенобиотиков, заметно увеличивало смертность биотипа Q *B. tabaci* после обработки насекомых имидаклопридом.

Рекомбинантный энтомопатогенный гриб *Isaria fumosorosea* Wize был использован для доставки в организм белокрылки дцРНК, подавляющей экспрессию гена *TLL7*, контролирующего синтез белка, связанного с иммунитетом, что привело к смертности 90% нимф (Chen et al., 2015). Конечно, подобные подходы представляют, в первую очередь, интерес для выяснения функций генов, а путь их до практики пока весьма далек хотя бы из соображений безопасности для полезной энтомофауны.

4.3. Цикадовые

Вредоносность ряда представителей подотряда цикадовых Auchenorrhyncha в последнее время существенно возросла с увеличением химических обработок посевов против других вредителей, в связи с чем большие надежды возлагаются на альтернативные методы борьбы, включая РНКи. В целом ряде работ изучались последствия подавления с помощью РНКи экспрессии различных жизненно важных генов у цикадок – злостных вредителей риса и других культур, а также опасных переносчиков фитопатогенных вирусов (Matsumoto, Hattori, 2018; Singh et al., 2018; Wang et al., 2018; Waris et al., 2018; Wang et al., 2019; Lou et al., 2019). Waris et al. (2018), подавив экспрессию хемосенсорного белка, вызвали ослабление поведенческих реакций у вредителя риса – бурой рисовой цикадки *N. lugens*. Matsumoto и Hattori (2018) с использованием РНКи установили важную роль эффекторного белка NcSP75, синтезируемого слюнными железами, в обеспечении возможности питания цикадки *Nephotettix cincticeps*

(Uhler) флэзмой. Lou et al. (2019) показали необходимость белка NChP38, содержащего домен участвующего в формировании оболочки яйца амелогенина, для нормальной овуляции *N. lugens*. Wang et al. (2018) указали на ген кальций-связывающего белка кальмодулина, важного для клеточной активности и участвующего в вителлогенезе, как потенциальную мишень для борьбы с бурой рисовой цикадкой посредством его сайленсинга с применением комплементарной дцРНК.

4.4. Мучнистые червецы

Мучнистые червецы (сем. Pseudococcidae, надсемейство Coccoidea) отличаются тем, что с ними трудно бороться химическими методами из-за покрытия их тела воском и обитания в недоступных для обработки частях растения (Omar et al., 2019). В связи с этим был предложен подход, основанный на доставке в растение определенных дцРНК с помощью вируса (Waqas et al., 2021). Инфекция табака рекомбинантным вирусом X картофеля, экспрессирующим дцРНК, нацеленные на гены хитинсинтазы 1 (*CHS1*) (Khan et al., 2015) и *bursicon* (Khan et al., 2018) мучнистого червеца *Phenacoccus solenopsis* Tinsley, привела к появлению морфологических аномалий и повышенной смертности у имаго вредителя, питавшихся на данных растениях, и их потомства. Подобным образом подавление генов, контролирующих актин, V-АТФазу и хитинсинтазу 1, при питании цитрусового червеца *Planococcus citri* (Risso) на табаке, инфицированном рекомбинантным вирусом табачной мозаики, приводило к снижению плодовитости и росту смертности насекомых (Khan et al., 2013).

4.5. Клопы

РНКи у клопов (Heteroptera) изучали как на растительных представителях семейств Miridae (Walker, Allen et al., 2011; Allen, Walker, 2012; Liu et al., 2019), Lygaeidae (Bewick et al., 2019), Pyrrhocoridae (Kostal, Tollarova-Borovanska, 2009; Kotwica-Rolinska et al., 2017), Alydidae (Ikeno et al., 2014), Pentatomidae (Sugahara et al., 2016; Mogilicherla et al., 2018; Castellanos et al., 2019; Souza et al., 2022; Finetti et al., 2023) и Scutelleridae (Amiri et al., 2016; Amiri, Bandani, 2020), многие из которых являются злостными вредителями сельскохозяйственных культур, так и на кровососущих видах – переносчиках опасных болезней человека и животных из семейств Reduviidae (Paim et al., 2013; Salcedo-Porrás et al., 2019; Finetti et al., 2023) и Cimicidae (Basnet, Kamble, 2018). В большинстве работ с клопами доставка дцРНК осуществлялась инъекцией, поверхностным нанесением или с кормом. Результаты экспериментов на разных видах и разных генах существенно отличались по эффективности сайленсинга, его продолжительности и влиянию на жизнеспособность насекомых.

Мраморный клоп *H. halys* из группы щитников (Pentatomidae) – серьезный вредитель сельскохозяйственных культур в Европе, на Ближнем Востоке, а также на американском континенте. Имеющиеся методы борьбы пока недостаточно эффективны и не смогли остановить его недавнее распространение на Юге России (Карпун и др., 2022). Доставка посредством инъекции или кормления дцРНК, нацеленных на гены *IAP*, *SNF7* и *PPI*, кодирующие ингибитор апоптоза, вакуолярный сортирующий белок SNF7 и протеинфосфатазу 1 соответственно, приводила к существенному снижению их экспрессии, что

сопровождалось более чем 70-процентной смертностью личинок и имаго *H. halys* (Mogilicherla et al., 2018). Сайленсинг генов кислой метилтрансферазы ювенильного гормона (*JHAMT*) и вителлогенина (*vg*) наблюдался после поглощения *H. halys* корма с соответствующими дцРНК (Ghosh et al., 2017). Castellanos et al. (2019) показали, что инкапсулирование в липосомы совместно с ЭДТА является одним из перспективных путей создания систем доставки в клетки питающихся флоэмным соком насекомых дцРНК, нацеленных на гены, контролирующие актин мышц и V-АТФазу А. Данный подход защитил дцРНК от деградации нуклеазами при доставке посредством питания, и обеспечил повышенную смертность другого представителя семейства Pentatomidae – клопа «коричневая вонючка» *Euschistus heros* (Fabricius).

Пока выполнено относительно немного исследований по РНКи у Miridae. Одной из проблем явилась низкая эффективность дцРНК при доставке с пищей, в отличие от инъекций, видимо из-за активности нуклеаз в слюнных железах, например у *Lygus lineolaris* (Palisot de Beauvois) (Allen, Walker, 2012). Однако известны и другие примеры. Так, питание клопа *Apolygus lucorum* (Meyer-Dur) на трансгенных кукурузе и сое, продуцирующих дцРНК против гена *AlucV-ATPase-E*, привело к массовой гибели клопов, что указывает на принципиальную возможность использования пероральной доставки дцРНК для борьбы с вредными Miridae (Liu et al., 2019).

Bewick et al. (2019), используя РНКи, показали, что ДНК-метилтрансфераза 1 (DNMT1) играет важную роль в формировании яиц и развитии зародышей клопа *Oncopeltus fasciatus* (Dallas) (Lygaeidae). Но подавление экспрессии контролирующего ее гена, сопровождающееся потерей жизнеспособности яиц, не оказывает заметного влияния на экспрессию других генов насекомого. Пример с *O. fasciatus* позволил Amukamara et al. (2020) предположить, что DNMT1 практически не участвует в метилировании ДНК и контроле экспрессии генов, но выполняет множество иных функций у некоторых групп насекомых.

Исследования по РНКи у представителя семейства Pyrrhocoridae – клопа-солдатика *Pyrrhocoris apterus* (L.) позволили установить роль генов циркадных ритмов в регуляции фотопериодизма (Kotwica-Rolinska et al., 2017) и выявить закономерности управления этими генами активностью кишечника через гормональную систему насекомых (Vajgar et al., 2013). Kostal et al. (2009) применив методы РНКи, обнаружили важную роль накопления белка теплового шока РаHsp70 в повышении толерантности *P. apterus* к холоду.

Представитель семейства Alydidae, соевый клоп *Riptortus pedestris* (Fabricius), вредящий на посевах сои в Китае и Южной Корее (Dong et al., 2022), послужил объектом изучения механизмов фотопериодизма с применением РНКи (Ikeno et al., 2014; Mano, Goto, 2022). Последние изучали молекулярные связи между циркадными часами и эндокринными сигнальными путями у *R. pedestris*. Они показали, что «часы» могут контролировать фотопериодический ответ, в частности, переход личинки во взрослую форму при коротком дне, за счет изменения экспрессии ключевых элементов двух независимых эндокринных путей, основанных на действии инсулин-подобного пептида ILP1 и ювенильного гормона.

Единственным представителем семейства Scutelleridae, ставшим объектом изучения методами РНКи пока является опасный вредитель пшеницы в России, Турции, Иране и ряде других стран Восточной Европы и Азии – клоп вредная черепашка *Eurygaster integriceps* Put. Amiri et al. (2016) и Amiri, Bandani (2020) изучали последствия сайленсинга генов сериновых и цистеиновых пищеварительных протеаз на разные стороны жизнедеятельности клопов. Экспрессия в кишечнике цистеиновой протеазы Cys подавлялась специфичной к ней дцРНК, доставленной в организм насекомого путем нанесения на кутикулу (Amiri et al., 2016). Наблюдавшиеся при этом аномалии формирования личинок позволили авторам предположить вовлеченность данной протеазы в процессы роста, развития и линьки клопов. Из сериновых протеаз Amiri и Bandani (2020) выбрали изоформу GHP3, гидролизующую белки клейковины пшеницы и охарактеризованную ранее Konarev et al. (2011) и Dolgikh et al. (2014) (GenBank, accession number HM579787.1). В работе иранских исследователей данная протеаза обозначена как Gluten Hydrolase (GH). Поверхностное нанесение нацеленной на ген протеазы дцРНК вызвало у личинок 5-го возраста почти полное подавление синтеза фермента в кишечнике и в то же время индукцию его синтеза в слюнных железах. Авторы предположили, что насекомое компенсирует снижение экспрессии гена в одной части пищеварительной системы индукцией его экспрессии в другой части. В свою очередь, введение дцРНК путем инъекции снижало экспрессию гена как в кишечнике, так и в слюнных железах, но через 21 час экспрессия восстанавливалась. Подавление экспрессии гена влияло на время развития нимфы, вес имаго и выживаемость. По-видимому, помимо участия в переваривании пищи, ген данной протеазы влияет и на другие важные физиологические процессы. По мнению авторов, технология РНКи потенциально пригодна для применения в стратегиях борьбы с этим вредителем. В целом, хотя растительноядные клопы являются опасными вредителями, работ по РНКи с ними пока меньше, чем, например, с тлями. Среди возможных причин этого – высокая нуклеазная активность в пищеварительных системах.

Исследования кровососущего триатомового клопа *Rhodnius prolixus* (Stål.) (Reduviidae), известного как «ноцелульный клоп» – опасного переносчика паразитов человека и животных, проводившиеся с использованием РНКи, посвящены, в частности, одорант-связывающим белкам, вовлеченным в процессы распознавания запахов и восприятия половых феромонов (Oliveira et al., 2018), иммунным системам, участвующим в регуляции взаимоотношений клопа и переносимого им паразита (Salcedo-Portas et al., 2019), а также особенностям функционирования синтезируемой слюнными железами синтазы оксида азота, обеспечивающей релаксацию гладкой мускулатуры кровеносных сосудов жертвы (Paim et al., 2017). Последние авторы изучали долговременные последствия РНКи и «родительскую» РНКи у *R. prolixus*, что может представлять интерес для функциональной геномики Hemiptera. Они инъекцировали нимфы клопа 3 и 5 возрастов дцРНК, нацеленными на экспрессирующиеся в слюнных железах гены белков-переносчиков окиси азота – нитрофоринов 1–4 и экспрессирующийся в кишечнике ген ингибитора тромбина – роднина. Снижение экспрессии обоих генов после

разовой инъекции сохранялось на протяжении нескольких месяцев, в том числе, при смене возрастов и достижении взрослой стадии. Интересно, что последствия в форме родительской РНКи наблюдались только после инъекции нимф 5-го возраста, где эффект сохранялся до 2-го возраста потомства F1. В случае инъекции нимф 3-го возраста такого эффекта не было.

Basnet, Kamble (2018) выясняли принципиальную возможность борьбы с постельным клопом *Cimex*

5. Нецелевое действие РНКи и пути его предотвращения

Применение РНКи для борьбы с вредными полужесткокрылыми насекомыми подразумевает, в первую очередь, высокую, например, по сравнению с инсектицидами, специфичность дцРНК при минимальных побочных эффектах по отношению к энтомофагам и другим насекомым, животным, людям, а также к растению-хозяину (Jain et al., 2021; Zhang et al., 2022). Нецелевое действие РНКи может быть связано с высоким сходством последовательностей применяемых форм РНК с последовательностями мРНК других организмов. Сайленсинг генов при РНКи включает использование уникальной последовательности из, как минимум, 20 оснований, комплементарной определенному участку гена, что обеспечивает высокую специфичность взаимодействия. Однако такие консервативные гены как, например, рецептор экдизона, содержат длинные последовательности общие для разных насекомых, что может губительным образом сказываться на энтомофагах (Chung et al., 2021). Интересно, что наибольшую эффективность сайленсинга генов у насекомых обеспечивают относительно длинные (более 200 пар нуклеотидов) дцРНК при том, что в случае коротких РНК длины в 21–22 пары нуклеотидов достаточно для подавления целевой экспрессии у тлей и белокрылок (Jain et al., 2021). «Слишком» длинные дцРНК дают начало многим коротким РНК, что может служить одной из причин для неспецифичной РНКи (Jain et al., 2020).

Очевидно, что при выборе оптимальных последовательностей дцРНК необходимо ориентироваться на видоспецифичные или уникальные последовательности генов или мРНК целевого организма, которые могут быть выявлены на основании данных геномного или транскриптомного анализов, а затем, для исключения нежелательных взаимодействий, сопоставлены с такими данными для полезных насекомых или человека (Christiaens, Smagge, 2014). Отдельный интерес в данном случае представляют гены, приобретенные вредителем в результате горизонтального переноса от бактерий, грибов и других организмов и включенные в геном (Chen et al., 2019a). Такие гены могут быть специфичными для рода или даже вида насекомого (Wybouw et al., 2016).

Следующим этапом должно быть изучение в лабораторных условиях последствий применения выбранных последовательностей в отношении целевого вредителя и основных полезных насекомых – пчел, энтомофагов, опылителей и т.д. Однако наиболее информативными для оценки влияния препаратов на экосистемы могут быть полевые исследования, проводимые под строгим контролем (Christiaens et al., 2020a,b).

Один из путей к ограничению нецелевого эффекта РНКи может быть основан на использовании микроРНК

lectularius L. (Cimicidae) методом РНКи. Инъекция специфичных дцРНК на протяжении 30 дней существенно подавляла экспрессию генов, контролирующих субъединицы А и Е V-АТФазы, жизненно важного фермента, обеспечивающего транспорт протонов через мембраны клеток и органелл. Это сопровождалось нарушениями процесса откладки яиц и снижением жизнеспособности клопов – на 30-й день после инъекции дцРНК, нацеленной на ген субъединицы Е, выжило лишь 20% особей.

(miRNAs) – вариантов малых (21–23 нуклеотидов) некодирующих РНК (Green et al., 2016; Bartel, 2018). Биогенез, структура и механизмы действия микроРНК подробно описаны в обзоре O'Brien et al. (2018) и другими исследователями и здесь не рассматриваются. В отличие от дцРНК, которые подавляют гены-мишени при полной комплементарности последовательностей, микроРНК кодируются в геноме как предшественники РНК и у животных подавляют экспрессию генов-мишеней при неполной комплементарности. Это снижает специфичность их действия и может приводить к иным последствиям – например, не к сайленсингу за счет дегградации мРНК, а лишь к ограничению трансляции (Chung et al., 2021; Ellwanger et al., 2011). Один вариант микроРНК может взаимодействовать с несколькими частично комплементарными им мРНК и таким образом регулировать экспрессию контролируемых их генов (Schwab et al., 2006). В свою очередь искусственные микроРНК позволяют повысить специфичность и ограничить нецелевые эффекты РНКи (Schwab et al., 2006; Peres et al., 2022).

МикроРНК растительного происхождения содержатся во флоэмном соке и при поглощении тлями они, пройдя через кишечник и гемолимфу, проникают в различные органы насекомого, включая содержащий бактерициты бактериом (Thompson et al., 2019). Известно, что полученные с пищей микроРНК растений могут оказывать влияние на экспрессию генов животных в различных органах (Vaucheret, Chupeau, 2012), что является примером информационно-генетических коммуникаций между двумя царствами природы (Zhao et al., 2018). По мнению Thompson et al. (2019) и Chung et al. (2021), микроРНК растений могут регулировать экспрессию генов в разных органах тлей, включая те, что влияют на взаимодействие хозяина и эндосимбионта. Механизмы формирования микроРНК в растениях и их транспортировки на этапах от флоэмного сока до клеток насекомых рассмотрены Thompson et al. (2019). Показано, что трансгенные растения, экспрессирующие искусственные микроРНК, могут быть эффективным средством борьбы с сосущими вредителями. Известны примеры использования механизмов биосинтеза РНК растений для получения зрелых микроРНК. Например, трансгенные растения табака, синтезирующие микроРНК против ряда генов *M. persicae*, включая ген ацетилхолинэстеразы, ограничивали экспрессию данных генов, а также выживаемость тлей (Guo et al., 2014). Позднее было обнаружено, что искусственная конструкция микроРНК, основанная на скелете пре-микроРНК (предшественника зрелой микроРНК) насекомых, которая обходит механизм обработки микроРНК растений и сохраняет исходную структуру, вызывает более высокие показатели смертности, в частности,

у чешуекрылых, чем конструкции пре-микроРНК самих растений (Bally et al., 2020; Chung et al., 2021).

Для того чтобы успешно использовать искусственные микроРНК в борьбе с вредителями в полевых условиях необходимо предварительно оценить их функции в организме насекомого. Полужесткокрылые, питающиеся флоэмным соком, не могут жить без своих бактерий-эндосимбионтов, следовательно, данное взаимодействие может являться перспективной мишенью для искусственных микроРНК, доставляемых посредством питания на растении. Feng et al. (2018b) составили перечень микроРНК, важных для скоординированного сосуществования тлей и облигатной симбиотической протеобактерии *Buchnera*. У тлей *M. persicae* и *A. pisum* были найдены микроРНК, которые либо активно экспрессировались в содержащих *Buchnera* бактериомах или дифференциально экспрессировались в

6. Способы доставки дцРНК в организмы тлей и других полужесткокрылых

Для успешного проведения экспериментов по РНК-интерференции на тлях необходимо выбрать наиболее эффективный способ доставки дцРНК в организм насекомого. Как и у других насекомых, дцРНК может быть введена непосредственно в тело тли путем инъекции, включена в состав искусственной диеты, в том числе введена в растение или его отдельные органы, или продуцироваться кормовым растением. Помимо трансгенных растений, постоянно экспрессирующих необходимую дцРНК, для экспериментальных целей можно использовать и временные схемы. Например, дцРНК, соответствующая генам тлей, может продуцироваться временно в листьях *N. benthamiana* после инфильтрации бактерией *Agrobacterium tumefaciens*, несущей ДНК, кодирующую дцРНК (Coleman et al., 2016). Препараты дцРНК также можно непосредственно наносить на покровы насекомого. В свою очередь, поглощение тлями дцРНК при питании растениями дает определенные преимущества перед другими способами введения действующего реагента в организм насекомого. Например, это дает возможность проводить эксперименты в более биологически адекватных условиях. Данный подход требует производить меньше манипуляций с насекомыми, предотвращает их повреждение и позволяет работать с несколькими видами насекомых сразу. Однако в случае тлей и других Hemiptera, питающихся флоэмным соком растений, этот метод не всегда работает, поскольку экспрессируемая клетками растений дцРНК не обязательно попадет в сок. Такая же проблема может возникнуть и при опрыскивании растения раствором дцРНК. В таком случае дцРНК может быть внедрена в состав сока путем вымачивания корней растения в содержащем ее растворе (Jain et al., 2020).

На усвоение клетками насекомого и соответственно эффективность РНКи может оказывать влияние длина дцРНК, причем оптимальная длина зависит от вида насекомого. Так, для достижения желаемой интерференции у жука *Tribolium castaneum* Herbst (Coleoptera: Tenebrionidae) было необходимо минимум 70 нуклеотидов (Miller et al., 2012). С другой стороны, успешная РНКи у гороховой тли *A. pisum* обеспечивалась при длине малой РНК в 21–27 нуклеотидов (Mutti et al., 2006). Малые интерферирующие РНК (siRNA) могут быть получены *in vitro* с использованием фермента Dicer, формы РНКазы III – одного из

бактериомах, заселенных другими бактериями. Возможно, что данные микроРНК направлены на гены тлей, кодирующие переносчики аминокислот или другие важные для эндосимбиотических взаимоотношений функции. На основании данных о комплементарности ряда микроРНК, выявляемых в бактериомах, и отдельных сайтов в геноме эндосимбионта *Buchnera* Feng et al. (2018a) и Chung et al. (2021) высказали предположение о нацеленности подобных микроРНК тлей непосредственно на геном эндосимбионта, хотя механизмы подобных взаимодействий пока неизвестны. Помимо подходов к защите растений, основанных на подавлении экспрессии генов насекомых или их эндосимбионтов с помощью микроРНК, сами микроРНК насекомых, вероятно, могут служить мишенями для соответствующего воздействия (Ran et al., 2018).

главных элементов механизма РНКи в клетке, продуцирующей малые РНК из дцРНК *in vivo* (Bernstein et al., 2001).

При инъекции или пероральном способе доставки препаратов РНК в организмы тлей для РНКи возможно эффективное применение как дцРНК, так и малых РНК (siRNA). Инъекция малой РНК против гена *COO2* приводила к подавлению экспрессии данного гена у гороховой тли *A. pisum*, сопровождавшейся увеличением ее смертности (Mutti et al., 2006). Пероральное введение малой РНК большой злаковой тле *S. avenae* снижало экспрессию генов обонятельных рецепторов (Fan et al., 2015). Имеющиеся сведения указывает на то, что, по крайней мере, у некоторых видов насекомых, включая тлей, малые РНК могут запускать реакцию РНКи при доставке в кишечник или гемолимфу насекомого. При этом пока остаются до конца не выясненными механизмы проникновения малых РНК в клетки насекомых (Chung et al., 2021).

Нет единого мнения относительно области мРНК, которой должна соответствовать двухцепочечная РНК (например, 5' или 3'). Например, у гороховой тли *A. pisum* не наблюдалось различий в смертности в группах насекомых, которым вводили дцРНК, совпадающую с 5'- или 3'-концом гена *hunchback* (*hb*) (Mao, Zeng, 2012). У других насекомых, в частности комаров, такие различия имели место, например, для гена, вызывающего апоптоз (Pridgeon et al., 2008).

Иногда обычные подходы к доставке дцРНК в организм тлей требуют слишком много времени для получения эффекта сайленсинга определенных генов, а постоянное равномерное снабжение дцРНК в течение нескольких поколений насекомого трудно осуществимо. Для преодоления данных препятствий Elston et al. (2022) была предпринята попытка использовать специально сконструированные бактериальные симбионты, способные продуцировать дцРНК в кишечнике гороховой тли. Данный метод симбионт-опосредованной РНКи ранее показал свою эффективность на клопах хищницах, трипсах (Whitten et al., 2016) и пчелах (Leonard et al., 2020). Хотя данный подход не привел пока к ощутимым результатам на гороховой тле, Elston et al. (2022) рассчитывают усовершенствовать его в дальнейшем.

6.1. Микроинъекции

Микроинъекция представляет собой классический метод доставки дцРНК в ткани насекомого для инициации ответа РНКи. Он считается предпочтительным подходом для фундаментальных и функциональных геномных исследований и предоставляет уникальные преимущества за счет простоты и высокой эффективности доставки точного количества молекул, ответственных за РНКи, в яйцеклетку, нимфу или взрослую особь. Кроме того, микроинъекция позволяет молекулам дцРНК достигать интересующую экспериментатора ткань или гемолимфу, тем самым обходя такие потенциальные барьеры, как покровы тела, нуклеазы слюнных желез и кишечника или мембранные структуры кишечника, которые могут препятствовать альтернативным методам доставки, включая кормление или поверхностное нанесение (Yu et al., 2013).

Микроинъекция была успешно использована для доставки молекул интерферирующей РНК во многих исследованиях полужесткокрылых, включая гороховую тлю *A. pisum* (Will et al., 2015), белокрылку *B. tabaci* (Ghanim et al., 2007) и других. Однако у микроинъекций есть и существенные недостатки, поскольку это деликатный и трудоемкий процесс, который не пригоден для защиты растений (Joga et al., 2016). Он требует оптимизации в соответствии со стадией развития целевых насекомых и обычно ограничивается более крупными полужесткокрылыми насекомыми и их яйцами. Более мелкие насекомые, в т.ч. многие виды тлей, получают значительные повреждения при инъекции, что влияет на их физиологию, увеличивает смертность и усложняет интерпретацию результатов. В целом, доставка дцРНК путем инъекций широко используется, в основном, в исследованиях функциональной геномики полужесткокрылых *in vivo* (Jain et al., 2020).

6.2. Выкармливание на искусственных средах

Выкармливание на искусственных средах применяется в экспериментах по РНК-интерференции на насекомых с колюще-сосущим ротовым аппаратом – тлях, белокрылках, листоблошках, цикадках и других (Andrade, Hunter, 2016). Данный подход преодолевает некоторые проблемы и ограничения, присущие микроинъекциям и пригоден для крупномасштабного скрининга мишеней РНКи у полужесткокрылых насекомых (Zhang et al., 2013). Выкармливание на искусственной диете было, например, успешно использовано при изучении функций различных генов у ряда Hemiptera, включая ген *Orco*, влияющий на поведение и морфологию большой злаковой тли *S. avenae* (Fan et al., 2015). Однако результативность этого подхода зависит как от вида насекомого, так и многих других факторов. Несмотря на использование во многих исследованиях, данный метод имеет ряд недостатков, которые необходимо учитывать. Среди них – трудность в определении точного количества дцРНК, поглощенного насекомым, высокая смертность насекомых в контрольных опытах и ускоренная деградация дцРНК за счет загрязнения раствора бактериями или грибами. Кроме того, для достижения ожидаемого эффекта сайленсинга генов может потребоваться высокая концентрация дцРНК в питательной жидкости вследствие ее частичной или полной деградации под действием нуклеаз слюнных желез и кишечника (Joga et al., 2016; Cooper et al., 2019). Одним из путей преодоления данного препятствия является помещение дцРНК в

липосомоподобные структуры или соединение их с наночастицами (Castellanos et al., 2018; Kunte et al., 2020; Guo et al., 2022).

Применимость искусственной диеты сильно зависит от биологических особенностей вида тлей. Современные методики позволяют поддерживать культуры некоторых видов на искусственной диете на протяжении длительного времени, что может существенно облегчить стандартизацию условий для РНКи, улучшить повторяемость результатов, а также значительно упростить техническую часть исследований. Так, van Emden и Wild (2020) разработали диету и подобрали условия, позволившую непрерывно разводить персиковую тлю *M. persicae* на искусственной среде в течение 30 лет без использования растений.

6.3. Местное (наружное) нанесение дцРНК на насекомых и растения (topical delivery)

Нанесение на поверхность тела насекомых препаратов с дцРНК в виде капель или спрея широко используется экспериментаторами. Данный подход лишен ряда недостатков других методов доставки и, при нанесении каплями, позволяет регулировать дозу дцРНК для проведения экспериментов по РНКи (Jain et al., 2021), что важно для получения воспроизводимых результатов. Этот метод также предоставляет возможность изучать функционально разнообразные и/или родственные гены у нескольких видов полужесткокрылых одновременно, тем самым экономя время и ресурсы. Так, местное нанесение дцРНК в течение четырех дней вызывало сайленсинг ряда генов, а также повышенную смертность у гороховой тли *A. pisum* (Niu et al., 2019). Местное нанесение варианта дцРНК, нацеленного на пять близкородственных цитохромов P450 азиатской цитрусовой листоблошки *Diaphoriana citri* Kuwayama, привело к снижению устойчивости насекомого к инсектициду имидаклоприду. Это указывает на возможность использования данного способа доставки дцРНК для одновременного подавления экспрессии нескольких генов у полужесткокрылых (Killiny et al., 2014).

Сходным образом местно нанесенная дцРНК, нацеленная на кишечную цистеиновую протеазу катепсин-L клопа вредная черепашка *E. integriceps*, проникала через кутикулу и нарушала развитие нимфальной стадии, подтверждая функциональную роль гена *cys* в развитии и линьке насекомого (Amiri et al., 2016). Однако у некоторых полужесткокрылых кутикула является труднопреодолимым препятствием для проникновения дцРНК в организм. Проблема может быть решена добавлением в состав раствора для нанесения пенетрантов и/или наночастиц, которые способны повысить стабильность дцРНК и облегчить ее проникновение через кутикулу. Каплю препарата, включающего дцРНК, специфичную к гемоцитину, гомологичному фактору фон Виллебранда млекопитающих, детергент и наночастицы, наносили на нотум соевой тли *A. glycines*, после чего дцРНК проникала через кутикулу и распространялась по всему телу (Zheng et al., 2019). Thairu et al. (2017) объединили малые РНК (siRNA), специфичные к важному для пигментации гену каротиндегидрогеназы *tor* и гену *bcat* трансаминазы, участвующей в метаболизме аминокислот с разветвленной цепью, в комплекс с наночастицами. Полученный препарат путем аэрозолизации нанесли на три вида тлей (*A. pisum*, *A. glycines* and *S. graminum*),

что значительно увеличило эффективность подавления экспрессии генов.

Другие примеры иллюстрируют возможности изучения последствий РНКи, а также ее эффективности и специфичности при использовании поверхностного нанесения раствора дцРНК в сравнении с иными методами доставки этого компонента в организм полужесткокрылого насекомого. Ранее Mogilicherla et al. (2018) наблюдали высокую смертность имаго мраморного клопа щитника *H. halys* (Pentatomidae) в результате РНКи, вызванной дцРНК, специфичными к трем генам (*HhPP1*, *HhIAP* и *HhATPase*), полученными насекомыми как при питании, так и посредством инъекции. Finetti et al. (2023) наносили каплями по 1 мкл аналогичные дцРНК в концентрации от 0.5 до 3 мкг/мкл на личинок *H. halys*. Все три дцРНК вызывали снижение транскрипции у *H. halys*, но только те из них, что были направлены на *HhIAP* (дцРНК-*HhIAP*) и *HhATPase*, приводили к увеличению смертности клопов, что свидетельствует о различиях в эффективности одних и тех же дцРНК в зависимости от способов их доставки. Осуществленное этими же авторами нанесение дцРНК-*HhIAP* на личинок клопа-хищница *Rhodnius prolixus* Stal (Reduviidae), переносчика опасной для человека болезни Шагаса, не влияло на уровень транскрипции и смертность насекомых. Не давала эффекта и дцРНК, направленная на родственный гену *HhIAP* *H. halys* ген *RpIAP* самого *R. prolixus* (дцРНК-*RpIAP*). Для выяснения возможного влияния способа доставки дцРНК на результаты РНКи у *R. prolixus*, дцРНК-*HhIAP* была введена путем инъекции, что привело к снижению транскрипции и росту смертности у данного клопа. В свою очередь, введение дцРНК-*HhIAP* не имело последствий для *R. prolixus*, что свидетельствует о высокой специфичности РНКи. Очевидно, что пригодность поверхностного нанесения дцРНК для экспериментов по РНКи или для ее использования на практике для борьбы с вредными полужесткокрылыми сильно зависит от их видовых особенностей. Такой подход применим, в частности, к мраморному клопу, но не годится для «поцелуйного клопа» *R. prolixus*, возможно, из-за особенностей строения его кутикулы (Finetti et al., 2023).

6.4. Использование растений и их частей для доставки дцРНК в организмы тлей и других Hemiptera

Экспрессия конструкций для РНКи, нацеленных на насекомых, в трансгенных растениях является многообещающим подходом к борьбе с сельскохозяйственными вредителями (Chung et al., 2021). Преимуществами трансгенных растений как средств доставки дцРНК/микроРНК в организм насекомых являются постоянство присутствия данных компонентов в растении и их распределение по всему растению, готовность к использованию последующих поколений растений для РНКи у насекомых и отсутствие дополнительных затрат на повторное применение. Существенным недостатком этого подхода являются присутствующие во многих странах опасения общественности относительно безопасности генной инженерии, трудности получения разрешения от регулирующих органов, в том числе, при импорте трансгенных семян или растений (Mehlhorn et al., 2021). Пока лишь немногие из конструкций, предназначенных для РНКи и перенесенных в генетически модифицированные растения, нашли коммерческое применение. Межвидовые и внутривидовые

различия в особенностях транспорта, поглощении клетками, процессинга и возможных путей деградации дцРНК или микроРНК в теле насекомых существенно влияют на эффективность РНКи, а также возможность развития устойчивости вредителей к РНКи в сельскохозяйственных условиях (Christiaens et al., 2020a,b). Необходимы дальнейшие исследования, как для определения оптимальных генных мишеней для эффективной РНК-интерференции у видов-вредителей, так и для снижения вероятности побочных эффектов у полезных видов при использовании трансгенных растений.

Первый трансгенный сорт кукурузы, экспрессирующий двухцепочечную РНК, комплементарную гену *DvSnf7* (Sucrose non-fermenting 7) западного кукурузного жука *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte, был одобрен для коммерческого производства в США в 2017 году (Head et al., 2017). Помимо заметного уменьшения повреждения корней данный подход замедлял появление резистентности к Bt-токсинам Cry3Bb1 и Cry34Ab1/Cry35Ab1 вследствие «эффекта пирамиды». РНКи на основе стабильных трансгенных растений показала эффективность в ограничении численности вредителей во многих комбинациях растений и насекомых, включая тлей (Chung et al., 2021; Zhang et al., 2022a). В таких подходах упор делался на сайленсинг генов основных путей метаболизма и развития насекомых, в том числе, гена *MyCP* кутикулярного белка у зеленой персиковой тли *M. persicae*, питающейся на арабидопсисе (Bhatia, Bhattacharya, 2018), гена ацетилхолинэстеразы *MpAChE2* у *M. persicae*, питающейся на табаке (с использованием искусственных микро РНК, amiRNAs) (Guo et al., 2014), и гена *SaZFP* цинксодержащего белка у большой злаковой тли *S. avenae*, питающейся на пшенице (Sun et al., 2019). В первых двух случаях наблюдалось снижение плодовитости, а в последнем – увеличение смертности, а также другие негативные для насекомых последствия, включая трансгенерационные. Так, однодневные новорожденные нимфы были перенесены с трансгенной пшеницы на растения дикого типа, на которых тли репродуцировались. Интересным результатом явилось то, что экспрессия *SaZFP* оказалась подавленной не только у родительских форм, которые питались на трансгенных линиях, но оставалась пониженной, по крайней мере, у четырех последующих поколений и составляла соответственно 20, 29, 44 и 80% от контрольной (Sun et al., 2019). То есть, экспрессия восстанавливалась, но с большой задержкой.

Секреты слюнных желез насекомых фитофагов содержат эффекторы – белки, которые подавляют защитные механизмы растений или создают благоприятные условия для питания насекомых на растении (Hogenhout, Bos, 2011; Kaloshian, Walling, 2016). У тлей и других Hemiptera с колюще-сосущим ротовым аппаратом таких эффекторов значительно больше, чем у грызущих насекомых. В связи с этим гены таких эффекторов являются очевидными мишенями для РНКи (Ray et al., 2022; Zhang et al., 2022b,c). Для выяснения целесообразности подобного применения гены различных белков, синтезируемых слюнными железами определенного сосущего вредителя, встраивают в геном кормового растения и оценивают эффект, оказываемый ими на жизненные показатели насекомого через ослабление защитных реакций растений. Гены, благоприятствующие развитию насекомого, выбирают в качестве

мишеней для РНКи, после чего создают трансгенные растения, продуцирующие нацеленные на эти гены дцРНК. Так, Elzinga et al. (2014) показали, что растения арабидопсиса, экспрессирующие ген белка слюнных желез *M. persicae* с неизвестной функцией (*Mp55*), обеспечивали более интенсивное размножение данного вида тли. В ответ на питание тлей у трансгенного арабидопсиса снижалось накопление веществ с защитной функцией – 4-метоксииндол-3-ил метилглюкозинолата, каллозы и перекиси водорода. Кроме того, растения, экспрессирующие ген *Mp55*, также были более привлекательными для тлей при выборе кормового растения. Подавление экспрессии гена *Mp55* в *M. persicae* с использованием РНКи понизило интенсивность размножения тли на трансгенных *N. tabacum*, *A. thaliana* и *N. benthamiana*, продуцирующих соответствующую дцРНК.

Весьма интересен ген, контролирующий фактор торможения миграции макрофагов 1 (*MIF1*). У позвоночных MIF являются важными противовоспалительными цитокинами, регулирующими иммунный ответ. Гомологи белков MIF также секретируются беспозвоночными, в частности, паразитическими, и участвуют в модуляции иммунных ответов хозяина (Karabowicz et al., 2022). Такой белок был обнаружен и в секрете тлей. Выяснилось, что экспрессия гена *MIF* тлей в тканях листьев трансгенных растений подавляет основные защитные реакции растений – экспрессию генов, связанных с защитой, отложение каллозы и гибель гиперчувствительных клеток (Naessens et al., 2015). Эти авторы показали, что экспрессия генов *MIF* имеет решающее значение для выживания, плодовитости и питания тли на растении-хозяине, а *MIF1*, являющийся членом семейства белков MIF, позволяет тлям эксплуатировать растения-хозяева. Питание *A. pisum* и *M. persicae* на трансгенных растениях, экспрессирующих дцРНК, нацеленные на гены *MIF1*, сопровождалось сайленсингом последних и снижением плодовитости тлей (Naessens et al., 2015).

По данным Xu et al. (2019a) секрет слюнных желез белокрылки *B. tabaci* содержит эффектор *Bt56*, который подавляет защитные механизмы табака путем активации сигнального пути салициловой кислоты через фактор транскрипции генов *KNOX*, что ведет к подавлению защитных реакций, запускаемых жасмонатным путем. Сайленсинг соответствующего гена с помощью специфичной дцРНК снижал выживаемость и плодовитость белокрылки при питании на трансгенном растении за счет невозможности активации салицилатного сигнального пути. Нормальное развитие тли восстанавливалось, когда насекомых переносили на трансгенные растения табака, сверхэкспрессирующие *Bt56*. Следует отметить, что в большинстве подобных экспериментов с РНКи на основе трансгенных растений развитие насекомых нарушалось, численность снижалась, но они не уничтожались полностью.

Гены насекомых, участвующие в детоксикации защитных вторичных метаболитов растений, например, глюкозинолатов у представителей Brassicaceae, также являются перспективными кандидатами на подавление посредством РНКи. Сайленсинг гена *GSTs5*, кодирующего глутатион-S-трансферазу, в ответ на экспрессию дцРНК у арабидопсиса повысил восприимчивость белокрылки *B. tabaci*

к данным метаболитам и задержал ее развитие (Eakteman et al., 2018). Эти авторы предположили, что подавление подобных генов с помощью РНКи, скорее всего, не устранит популяции вредителей с полей культур семейства капустных, но значительно снизит их численность в течение вегетационного периода и поддержит активность их естественных врагов, что в конечном итоге позволит создать устойчивую агроэкосистему.

Гены, которые экспрессируются в кишечнике тлей, относительно более доступны для ингибирования конструкциями для РНКи и являются привлекательными мишенями для разработки подходов к борьбе с вредителями с использованием трансгенных растений. Так, сайленсинг генов катепсинов L приводил к снижению активности данных цистеиновых протеаз в кишечнике *M. persicae* при питании на трансгенном табаке, что отрицательно сказывалось на их жизнеспособности – сопровождалось смертностью на уровне 80% и снижением плодовитости (Rauf et al., 2019). Авторы предположили, что подобный результат может быть отчасти связан с потерей способности тлей эффективно детоксицировать защитные белки растений. Кроме того, ограничение потребления белков сопровождалось снижением содержания белков в самих тлях, что снижало их питательную ценность для хищника семиточечной коровки *Coccinella septempunctata* L. (Coccinellidae), что Rauf et al. (2019) расценивают как непрямое негативное воздействие на природного энтомофага.

Для того, чтобы использовать растения для доставки дцРНК в организм насекомого с колюще-сосущим аппаратом и обойти ограничения, связанные с трансгенными растениями, необходимо создать достаточную концентрацию данного реагента в их сосудистой системе другими способами. Была показана возможность обеспечения высокой концентрации дцРНК в сосудах ряда древесных и других растений путем вымачивания корней или опрыскивания листьев соответствующими растворами (Hunter et al., 2012; Ghosh et al., 2017). Использование частей растения – листьев, стеблей и черенков, вобравших в себя дцРНК, показало свою эффективность в экспериментах по РНКи на различных Hemiptera, питающихся как флоэмой (листоблошка *Diaphorina citri* Kuwayama), так и ксилемой (цикадка *Homalodisca vitripennis* (Germar)) (Hunter et al., 2012). Данный растительный материал сохранял пригодность для использования в опытах на протяжении 40 дней. Питание насекомых на таких растениях или их частях приводило к повышению смертности, снижению жизнеспособности яиц, а также к изменениям в развитии личинок (Andrade, Hunter, 2016).

Упомянутый подход может оказаться эффективным и в случаях, когда доставка дцРНК в организм насекомых иными способами сопряжена со значительными трудностями. Так, вителлогенин является наиболее важным белком в вителлогенезе – синтезе и накоплении желтка в развивающихся ооцитах, процессе, регулируемом ювенильным гормоном (Wu et al., 2021). Было показано, что доставка дцРНК, специфичных к генам кислой метилтрансферазы ювенильного гормона (*JHAMT*) и вителлогенина (*Vg*) мраморного клопа *H. halys*, посредством замачивания растений или их отдельных частей значительно снижает экспрессию целевых генов насекомого, питающихся таким кормом, что доказывает пригодность

подобного подхода для работы с этим вредителем (Ghosh et al., 2017). В свою очередь, питание тлей *A. citricidus* на черенках лимона, выдержанных в растворе, содержащем дцРНК, специфичные к генам вителлогенина (*Vg*) и его рецептора (*VgR*), привело к задержке превращения нимфы во взрослую особь, удлинению предрепродуктивного периода и укорочению самого репродуктивного периода, что, в свою очередь, привело к замедлению эмбрионального развития и меньшему количеству отрождённых нимф (Shang et al., 2018).

Таким образом, имеющиеся сведения указывают на то, что данный способ доставки дцРНК может быть привлекательной и биологически более естественной альтернативой другим методам для подавления экспрессии генов-мишеней насекомых как при исследованиях в области функциональной геномики у полужесткокрылых насекомых, так и для защиты растений (Jain et al., 2020). К другим преимуществам способа доставки дцРНК через «вобравшие» ее в себя растения можно отнести отсутствие необходимости создавать трансгенные растения, а также простоту смены используемых генетических конструкций. Среди недостатков – невозможность точного дозирования действующего вещества, что может осложнить интерпретацию результатов. Кроме того, не для всех растений, например злаков, может оказаться пригодной инъекция в стебель (Fletcher et al., 2020; Jain et al., 2021).

7. Факторы, ограничивающие эффективность РНК интерференции у тлей и пути ее повышения

Эффективность РНКи сильно различается у представителей разных таксономических групп насекомых, причем основными факторами, обуславливающими подобные различия являются особенности расщепления дцРНК дцРНКазами и их процессинга в клетках до коротких интерферирующих РНК (siRNAs) (Wang et al., 2016; Singh et al., 2017). У разных видов насекомых, включая тлей, были выявлены и внутривидовые генетические различия по чувствительности к РНКи, (Yoon et al., 2020). Чувствительность среди 83 генотипов гороховой тли *A. pisum* к полученной перорально дцРНК против гена аквапорина *AQP1* варьировала от нулевой до 100-процентной смертности. Совместное применение данной дцРНК с дцРНК против ряда других генов тли могло приводить либо к снижению, либо к повышению смертности тлей, что говорит о существенном влиянии различных генов насекомого на эффективность РНКи в отношении целевого гена.

Заключение

Огромное разнообразие стратегий борьбы с вредителями может сравниться только со способностью насекомых преодолевать их. Очевидно, что эффективность подходов, основанных на РНКи, будет зависеть от того, в какой мере в них учтены биологические особенности вредного организма (Shelby et al., 2020). Несмотря на очевидный потенциал применения РНКи в борьбе с тлями и другими сосущими вредителями, для практического использования в сельском хозяйстве эти подходы нуждаются в существенном совершенствовании. Важными условиями для эффективной РНКи являются выявление целевых генов, подавление экспрессии которых приводит к наиболее тяжелым последствиям для вредителя, подбор оптимальной длины дцРНК и выбор надежного способа ее доставки

Отсутствие положительных результатов РНК-интерференции при использовании различных вариантов питания насекомых не обязательно указывает на нечувствительность насекомого к данному методу. В большинстве случаев у тлей, как и других насекомых, в секрете слюнных желез, средней кишке или даже в гемолимфе, содержатся нуклеазы, которые расщепляют дцРНК, что предотвращает ее поглощение клетками и запуск механизмов интерференции (Christiaens et al., 2014; Ghodke et al., 2019).

Помимо деградации РНК в пищеварительной системе насекомых нуклеазами, на эффективность сайленсинга генов при РНКи могут влиять также особенности поглощения дцРНК клетками и процессинга дцРНК в малые РНК, а также и системное распространение сигнала РНКи по организму. Очевидно, что необходимо учитывать видоспецифичную и раса-специфичную чувствительность к РНКи как при использовании РНКи в качестве инструмента функциональной геномики, так и при скрининге генов-кандидатов для РНК-опосредованной борьбы с вредителями (Chung et al., 2021). Подавление экспрессии генов нуклеаз в кишечнике может защитить дцРНК от деградации и усилить эффект от подавления целевых генов насекомых, в том числе и у тлей (Chung et al., 2018; Kunte et al., 2020; Silver et al., 2021).

В случае трансгенных растений на эффективность РНКи может оказывать влияние происходящий там процессинг дцРНК. Bolognesi et al. (2012) обнаружили, что клетки насекомых в большей мере поглощают длинные дцРНК, чем малые РНК. Деградация дцРНК под действием эндогенного механизма РНКи растения, включая ферменты *Dicer*, может нивелировать результативность РНКи в отношении фитофага. Среди возможных путей решения данной проблемы для подавления генов тлей и других сосущих вредителей может быть использование промоторов, обеспечивающих экспрессию дцРНК, локализованную во флоэме (Sun et al., 2019). В свою очередь, экспрессия дцРНК в трансформированных пластидах, показавшая отчетливые результаты РНКи в отношении грызущих вредителей (Zhang et al., 2015; Bally et al., 2016), оказалась неэффективной в отношении питающегося флоэмой сосущего вредителя – белокрылки *B. tabaci* (Dong et al., 2020). При этом питание белокрылки на трансгенном растении, в ядрах которого экспрессировалась соответствующая дцРНК, привело к существенному снижению жизнеспособности вредителя.

в организм насекомого (Zhang et al., 2022a). Необходимо также добиваться адекватного поставленным задачам уровня экспрессии дцРНК, а также высокой стабильности последней (Chung et al., 2021). Перспективным подходом к борьбе с различными полужесткокрылыми является применение рекомбинантных вирусов для доставки дцРНК, запускающих РНКи, однако для его реализации на практике в сельском хозяйстве потребуются преодолеть множество технических и организационных (юридических) проблем (Jain et al., 2021). Уже стало очевидным, что параллельное подавление нескольких генов со сходными физиологическими функциями может повысить эффективность РНКи у питающихся флоэмным соком Hemiptera (Tzin et al., 2015). «Эффект пирамиды» ярко проявляется в

одновременном подавлении различных жизненно важных генов у различных полужесткокрылых насекомых, а также у других вредных беспозвоночных, включая нематод (Lisei-de-Sá et al., 2021).

Еще один многообещающий подход заключается в сочетании РНКи с разнообразными токсинами. Одновременное применение РНКи и Vt-токсинов в одном и том же растении способно не только повысить устойчивость к вредителям, но и замедлить выработку резистентности вредителя к обоим факторам за счет «эффекта пирамиды», что уже было показано на чешуекрылых (Ni et al., 2017). Хотя известные формы Vt-токсинов являются малоэффективными по отношению к Hemiptera, уже намечены пути их модификации для повышения токсичности к этой группе вредителей (Chougule, Bonning, 2012), в том числе, путем встраивания в токсин Cгу4Аа сайтов, доступных для протеолиза кишечными протеазами тлей, что обеспечивает активацию токсина (Rausch et al., 2016). Обнаружены и другие бактериальные токсины, проявляющие токсичность к полужесткокрылым (Mishra et al., 2022). Кроме того, в «пирамидных» схемах совместно с РНКи могут быть использованы гены ингибиторов протеиназ, лектинов, а также других инсектицидных белков (Shukla et al., 2016; Jain et al., 2021). Несмотря на то, что РНКи пока имеет ограниченное практическое применение для защиты растений, уже известны примеры появления в

полевых условиях резистентности к РНКи, пока, однако, только для жука *D. virgifera virgifera* (Khajuria et al., 2018). При разработке стратегий РНКи, направленных на борьбу с полужесткокрылыми, необходимо принимать во внимание факторы, способствующие появлению резистентности к данному подходу и тщательно отбирать среди целевых генов наиболее важные для жизнедеятельности насекомого (Shelby et al., 2020). Следует учитывать также, что пока еще недостаточно изучены возможные негативные последствия РНКи, направленной на подавление определенного вредителя, в отношении других видов насекомых, включая энтомофагов (Chung et al., 2021).

Наиболее значимыми для практики защиты растений от тлей и других полужесткокрылых, по мнению Zhang et al. (2022a), пока являются технологии РНКи, основанные на использовании трансгенных растений, а также спреев. В настоящее время трансгенные растения находятся под запретом во многих странах, и, кроме того, не все культуры поддаются требуемой трансформации. Альтернативу представляют спреи, однако их слабым местом является низкая стабильность дцРНК в полевых условиях. По-видимому, проблема с трансгенными растениями будет все же когда-нибудь решена, а стабильность дцРНК после нанесения в составе спреев удастся существенно повысить путем включения их в комплекс с наночастицами (Kumar et al., 2019; Fletcher et al., 2020).

Библиографический список (References)

- Долгих ВВ, Сендерский ИВ, Конарев АВ (2014) Получение и свойства рекомбинантных протеиназ *Eurygaster integriceps* Put., гидролизующих глютеин. *Прикладная биохимия и микробиология* 50(5): 466–474. <https://doi.org/10.7868/S0555109914040205>
- Журавлев ВС, Долгих ВВ, Тимофеев СА, Ганнибал ФБ (2022) Метод РНК-интерференции в защите растений от насекомых-вредителей. *Вестник защиты растений* 105(1):28–39. <https://doi.org/10.31993/2308-6459-2022-105-1-15219>
- Карпун Н, Борисов Б, Журавлева Е, Борисова И и др (2022) Расширение ареалов и повышение вредоносности растительноядных клопов-щитников. *Сельскохозяйственная биология* 57(3):542–554. <https://doi.org/10.15389/agrobiol.2022.3.542rus>
- Максимов ИВ, Шейн МЮ, Бурханова ГФ (2021) РНК-интерференция в защитных системах растений. *Физиология растений* 68(4):356–370. <http://doi.org/10.31857/S0015330321030131>
- Радченко ЕЕ (2017) Устойчивость картофеля к тлям. *Вавиловский журнал генетики и селекции* 21(1):74–82. <https://doi.org/10.18699/VJ17.225>
- Синёв СЮ (2013) Обзор современных представлений о системе класса насекомых. *Труды Зоологического института РАН* 317(S2):155–173. https://www.zin.ru/journals/trudyzin/doc/vol_317_s1/TZ_317_1_Supplement_Sinev.pdf
- Abdellatef E, Will T, Koch, A, Imani J et al (2015) Silencing the expression of the salivary sheath protein causes transgenerational feeding suppression in the aphid *Sitobion avenae*. *Plant Biotechnol J* 13:849–857. <https://doi.org/10.1111/pbi.12322>
- Ahman I, Kim SY, Zhu LH (2019) Plant genes benefitting aphids – potential for exploitation in resistance breeding. *Front Plant Sci* 10:1452. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01452>
- Allen ML, Walker III WB (2012) Saliva of *Lygus lineolaris* digests double stranded ribonucleic acids. *J Insect Physiol* 58(3):391–396. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2011.12.014>
- Amiri A, Bandani AR (2020) Gluten hydrolase gene silencing using RNAi and its effect on the Sunn pest growth and development. *Phytoparasitica* 48:575–587. <https://doi.org/10.1007/s12600-020-00821-8>
- Amiri A, Bandani AR, Alizadeh H (2016) Molecular identification of cysteine and trypsin protease, effect of different hosts on protease expression, and rnai mediated silencing of cysteine protease gene in the sunn pest. *Arch Insect Biochem Physiol* 91(4):189–209. <https://doi.org/10.1002/arch.21311>
- Amukamara AU, Washington JT, Sanchez Z, McKinney EC et al (2020) More than DNA methylation: does pleiotropy drive the complex pattern of evolution of Dnmt1? *Front Ecol Evol* 8:4. <https://doi.org/10.3389/fevo.2020.00004>
- Andrade ED, Hunter WB (2016) RNA interference–natural gene-based technology for highly specific pest control (HiSPeC). In: Abdurakhmonov Y (ed.) RNA interference. London: IntechOpen. 6:391. <http://dx.doi.org/10.5772/61612>
- Bajgar A, Jindra M, Dolezel D (2013) Autonomous regulation of the insect gut by circadian genes acting downstream of juvenile hormone signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:4416–4421. <https://doi.org/10.1073/pnas.1217060110>
- Bally J, Fishilevich E, Doran RL, Lee K (2020). PlinamiR, a pre-microRNA-based technology for controlling

- herbivorous insect pests. *Plant Biotechnol J* 18(9):1925–1932. <https://doi.org/10.1111/pbi.13352>
- Bally J, McIntyre GJ, Doran RL, Lee K et al (2016) In-plant protection against *Helicoverpa armigera* by production of long hpRNA in chloroplasts. *Front Plant Sci* 7:1453. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01453>
- Barnard AC, Nijhof AM, Fick W, Stutzer C et al (2012) RNAi in arthropods: insight into the machinery and applications for understanding the pathogen-vector interface. *Genes (Basel)* 3(4):702–741. <http://doi.org/10.3390/genes3040702>
- Bartel DP (2018). Metazoan MicroRNAs. *Cell* 173(1): 20–51. doi:10.1016/j.cell.2018.03.006
- Basnet S, Kamble ST (2018) RNAi-mediated knockdown of vATPase subunits affects survival and reproduction of bed bugs (Hemiptera: Cimicidae). *J Med Entomol* 55(3):540–546. <https://doi.org/10.1093/jme/tjy001>
- Baumann P, Moran NA, Baumann LC (2013) 19 Bacteriocyte-associated endosymbionts of Insects. In: Rosenberg E et al (eds) *The Prokaryotes – Prokaryotic biology and symbiotic associations*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag 483–514. https://doi.org/10.1007/978-3-642-30194-0_19,
- Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ (2001). Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 409: 363–366. <https://doi.org/10.1038/35053110>
- Bewick AJ, Sanchez Z, Mckinney EC, Moore AJ et al (2019) Dnmt1 is essential for egg production and embryo viability in the large milkweed bug, *Oncopeltus fasciatus*. *Epigenetics Chromatin* 12:6. <https://doi.org/10.1186/s13072-018-0246-5>
- Bhatia V, Bhattacharya R (2018) Host-mediated RNA interference targeting a cuticular protein gene impaired fecundity in the green peach aphid *Myzus persicae*. *Pest Manag Sci*, 74:2059–2068. <https://doi.org/10.1002/ps.4900>
- Bolognesi R, Ramaseshadri P, Anderson J, Bachman P et al (2012) Characterizing the mechanism of action of double-stranded RNA activity against western corn rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera* LeConte). *PLoS One* 7:e47534. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047534>
- Castellanos NL, Smagghe G, Sharma R, Oliveira EE et al (2019) 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* 75:537–548. <https://doi.org/10.1002/ps.5167>
- Chandra GS, Asokan R, Manamohan M, Kumar NK (2019) Enhancing RNAi by using concatemeric double-stranded RNA. *Pest Manag Sci* 75:506–514. <https://doi.org/10.1002/ps.5149>
- Chen W, Shakir S, Bigam M, Richter A et al (2019a) Genome sequence of the corn leaf aphid (*Rhopalosiphum maidis* Fitch). *Gigascience*. 8(4):giz033. <https://doi.org/10.1093/gigascience/giz033>
- Chen X, Xia J, Shang Q, Song D, Gao X (2019b) UDP-glucosyltransferases potentially contribute to imidacloprid resistance in *Aphis gossypii* Glover based on transcriptomic and proteomic analyses. *Pestic Biochem Physiol* 159:98–106. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2019.06.002>
- Chen X, Li L, Hu Q, Zhang B (2015) Expression of dsRNA in recombinant *Isaria fumosorosea* strain targets the TLR7 gene in *Bemisia tabaci*. *BMC Biotechnol* 15:64. <https://doi.org/10.1186/s12896-015-0170-8>
- Chougule NP, Bonning BC (2012) Toxins for transgenic resistance to hemipteran pests. *Toxins* 4(6):405–429. <https://doi.org/10.3390/toxins4060405>
- Christiaens O, Smagghe G (2014) The challenge of RNAi-mediated control of hemipterans. *Curr Opin Insect Sci*. 6:15–21. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2014.09.012>
- Christiaens O, Niu J, Nji Tizi Tanning C (2020a) RNAi in insects: a revolution in fundamental research and pest control applications. *Insects* 11:415. doi: <http://doi.org/10.3390/insects11070415>
- Christiaens O, Swevers L, Smagghe G (2014) DsRNA degradation in the pea aphid (*Acyrtosiphon pisum*) associated with lack of response in RNAi feeding and injection assay. *Peptides* 53:307–314 <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2013.12.014>
- Christiaens O, Whyard S, Vélez AM, Smagghe G (2020b) Double-Stranded RNA Technology to Control Insect Pests: Current Status and Challenges. *Front Plant Sci* 11:451. doi: 10.3389/fpls.2020.00451
- Chung SH, Feng H, Jander G (2021) Engineering pest tolerance through plant-mediated RNA interference. *Curr Opin Plant Biol* 60:102029. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2021.102029>
- Chung SH, Jing X, Luo Y, Douglas AE (2018) Targeting symbiosis-related insect genes by RNAi in the pea aphid-*Buchnera* symbiosis. *Insect Biochem Mol Biol* 95:55–63. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2018.02.004>
- Coleman AD, Wouters RHM, Mugford ST, Hogenhout SA (2014) Persistence and transgenerational effect of plant-mediated RNAi in aphids. *J Exp Bot* 66:541–548. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru450>
- Coleman AD, Mugford ST, Hogenhout SA (2016). Silencing of aphid genes by dsRNA feeding from plants. In: Czosnek H, Ghanim M (eds) *Management of Insect Pests to Agriculture*. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-24049-7_10
- Cooper AM, Silver K, Zhang J, Park Y, Zhu KY (2019) Molecular mechanisms influencing efficiency of RNA interference in insects. *Pest Manag Sci* 75(1):18–28. <https://doi.org/10.1002/ps.5126>
- Davis GK (2012) Cyclical parthenogenesis and viviparity in aphids as evolutionary novelties. *J Exp Zool B Mol Dev Evol* 318(6):448–59. <https://doi.org/10.1002/jez.b.22441>
- Dedryver CA, Le Ralec A, Fabre F (2010) The conflicting relationships between aphids and men: a review of aphid damage and control strategies. *C. R. Biol.* 333: 539–553. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2010.03.009>
- Ding BY, Shang F, Zhang Q, Xiong Y et al (2017) Silencing of two insulin receptor genes disrupts nymph-adult transition of alate brown citrus aphid. *Int J Mol Sci* 18(2):357. <https://doi.org/10.3390/ijms18020357>
- Dolgikh VV, Senderskii IV, Konarev AV (2014) Production and properties of recombinant glutenin-hydrolyzing proteinases from *Eurygaster integriceps* Put. *Appl Biochem Microbiol* 50:433–440. <https://doi.org/10.1134/S0003683814040048>
- Dong Y, Huang X, Yang Y, Li J (2022) Characterization of salivary secreted proteins that induce cell death from *Riptortus pedestris* (Fabricius) and their roles in insect-plant interactions. *Front Plant Sci* 13: 912603. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.912603>
- Dong Y, Yang Y, Wang Z, Wu M (2020) Inaccessibility to double-stranded RNAs in plastids restricts RNA interference

- in *Bemisia tabaci* (whitefly). *Pest management science (Pest Manag Sci)*;76(9):3168–3176. <https://doi.org/10.1002/ps.5871>
- Eakteiman G, Moses-Koch R, Moshitzky P, Mestre-Rincon N et al (2018) Targeting detoxification genes by phloem-mediated RNAi: A new approach for controlling phloem-feeding insect pests. *Insect Biochem Mol Biol* 100:10–21. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2018.05.008>
- Ellwanger DC, Büttner FA, Mewes HW, Stumpflen V (2011). The sufficient minimal set of miRNA seed types. *Bioinformatics*. 27 (10): 1346–50. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr149.PMC3087955>.
- Elston KM, Maeda GP, Perreau J, Barrick JE (2022) Addressing the challenges of symbiont-mediated RNAi in aphids. *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2022.08.28.505609>
- Elzinga DA, De Vos M, Jander G (2014) Suppression of plant defenses by a *Myzus persicae* (green peach aphid) salivary effector protein. *Mol Plant Microbe Interact* 27(7):747–756. <http://dx.doi.org/10.1094/MPMI-01-14-0018-R>
- Ergin GO, Ozturk A, Gorur G (2022) Evaluation of interactions among aphids, endosymbionts, and host plants: a foresight for the future. *Atatürk Üniv Ziraat Fak Derg* 2022;53(2):133–9. <https://doi.org/10.54614/AUAF.2022.1002421>
- Fan J, Zhang Y, Francis, F, Cheng D et al (2015) Orco mediates olfactory behaviors and winged morph differentiation induced by alarm pheromone in the grain aphid, *Sitobion avenae*. *Insect Biochem Mol Biol* 64:16–24. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2015.07.006>
- Feinberg EH, Hunter CP (2003) Transport of dsRNA into cells by the transmembrane protein SID-1. *Science* 301:1545–1547. <https://doi.org/10.1126/science.108711>
- Feng H (2018a) Regulation of interactions between sap-feeding insects and their obligate endosymbionts (Doctoral dissertation, University of Miami). ProQuest Dissertations Publishing, 10790744. <https://www.proquest.com/openview/61a634ee773278621f650e600fb82b7e/1?pq-origsite=gscholar&cbl=18750>
- Feng H, Wang L, Wuchty S, Wilson AC (2018b) microRNA regulation in an ancient obligate endosymbiosis. *Mol Ecol* 27(8):1777–1793. <https://doi.org/10.1111/mec.14464>
- Finetti L, Benetti L, Leyria J, Civolani S et al (2023) Topical delivery of dsRNA in two hemipteran species: evaluation of RNAi specificity and non-target effects. *Pestic Biochem Physiol* 189:105295. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2022.105295>
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA et al (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 391(6669):806–811. <https://doi.org/10.1038/35888>
- Fletcher SJ, Reeves PT, Hoang BT, Mitter NA (2020) A perspective on RNAi-based biopesticides. *Front. Plant Sci* 11:51. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00051>
- Forero D. The systematics of the Hemiptera (2008) *Rev Colomb Entomol* 34(1):1–21. <http://www.scielo.org.co/pdf/rcen/v34n1/v34n1a01.pdf>
- Green D, Dalmay T, Chapman T (2016) Microguards and micromessengers of the genome. *Heredity* 116 (2): 125–134. doi:10.1038/hdy.2015.84
- Gao Y, Ren R, Peng J, Wang D et al (2021) The gustavus gene can regulate the fecundity of the green peach aphid, *Myzus persicae* (Sulzer). *Front Physiol* 11:596392. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.596392>
- Ghanim M, Kontsedalov S, Czosnek H (2007) Tissue-specific gene silencing by RNA interference in the whitefly *Bemisia tabaci* (Gennadius). *Insect Biochem Mol Biol* 37:732–738. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2007.04.006>
- Ghodke AB, Good RT, Golz JF, Russell DA et al (2019) Extracellular endonucleases in the midgut of *Myzus persicae* may limit the efficacy of orally delivered RNAi. *Sci Rep* Aug 15;9(1):1–4. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47357-4>
- Ghosh SK, Hunter WB, Park AL, Gundersen-Rindal DE (2017) Double strand RNA delivery system for plant-sap-feeding insects. *PLoS one* 12(2):e0171861. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171861>
- Gong YH, Yu XR, Shang QL, Shi XY, Gao XW (2014) Oral delivery mediated RNA interference of a carboxylesterase gene results in reduced resistance to organophosphorus insecticides in the cotton aphid, *Aphis gossypii* Glover. *PLoS one*. 9(8):e102823 2014 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0102823>
- Grover S, Jindal V, Banta G, Taning CN et al (2019) Potential of RNA interference in the study and management of the whitefly, *Bemisia tabaci*. *Arch Insect Biochem Physiol* 100(2):e21522. <https://doi.org/10.1002/arch.21522>
- Guo HY, Song XG, Wang GL, Yang K et al (2014) Plant-generated artificial small RNAs mediated aphid resistance. *PLoS One* 9:e97410. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097410>
- Guo Y, Fan Y, Teng Z, Wang L et al (2022) Efficacy of RNA interference using nanocarrier-based transdermal dsRNA delivery system in the woolly apple aphid, *Eriosoma lanigerum*. *Arch Insect Biochem Physiol* 110(2):e21888. <https://doi.org/10.1002/arch.21888>
- He C, Liang J, Liu S, Wang S et al (2019) Changes in the expression of four ABC transporter genes in response to imidacloprid in *Bemisia tabaci* Q (Hemiptera: Aleyrodidae). *Pestic Biochem Physiol* 153:136–143. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2018.11.014>
- Head GP, Carroll MW, Evans SP, Rule DM et al (2017) Evaluation of SmartStax and SmartStax PRO maize against western corn rootworm and northern corn rootworm: efficacy and resistance management. *Pest Manag Sci*73(9):1883–1899. <https://doi.org/10.1002/ps.4554>
- Hogenhout SA, Bos JI (2011) Effector proteins that modulate plant–insect interactions. *Curr Opin Plant Biol* 14(4):422–428. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2011.05.003>
- Hunter WB, Glick E, Paldi N, Bextine BR (2012) Advances in RNA interference: dsRNA treatment in trees and grapevines for insect pest suppression. *Southwest Entomol* 37:85–7. <http://dx.doi.org/10.3958/059.037.0110>
- i5K Consortium (2013) The i5K initiative: advancing arthropod genomics for knowledge, human health, agriculture, and the environment. *J Heredity* 104:595–600. <http://doi.org/10.1093/jhered/est050>.
- Ikeno T, Numata H, Goto SG, Shiga S (2014) Involvement of the brain region containing pigment-dispersing factor-immunoreactive neurons in the photoperiodic response of the bean bug, *Riptortus pedestris*. *J Exp Biol* 217:453–462. <https://doi.org/10.1242/jeb.091801>

- Jain RG, Robinson KE, Asgari S, Mitter N (2021) Current scenario of RNAi-based hemipteran control. *Pest Manag Sci* 77(5):2188–96. <https://doi.org/10.1002/ps.6153>
- Jain RG, Robinson KE, Fletcher SJ, Mitter N (2020) RNAi-based functional genomics in Hemiptera. *Insects* 11(9):557. <http://doi.org/10.3390/insects11090557>
- Jaubert-Possamai S, Le Trionnaire G, Bonhomme J, Christophides GK et al (2007) Gene knockdown by RNAi in the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. *BMC biotechnol* 7(1):1–8. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-7-63>
- Jockusch EL, Fisher CR (2021) Something old, something new, something borrowed, something red: the origin of ecologically relevant novelties in Hemiptera. *Curr Opin Genet Dev* 69:154–62. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2021.04.003>
- Joga MR, Zotti MJ, Smagge G, Christiaens O (2016) RNAi efficiency, systemic properties, and novel delivery methods for pest insect control: what we know so far. *Front Physiol* 7:553. <https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00553>
- Kaloshian I, Walling LL (2016) Hemipteran and dipteran pests: effectors and plant host immune regulators. *J Integr Plant Biol* 58(4):350–61. <https://doi.org/10.1111/jipb.12438>
- Kanakala S, Kotsedalov S, Lebedev G, Ghanim M (2019) Plant-mediated silencing of the whitefly *Bemisia tabaci* cyclophilin B and heat shock protein 70 impairs insect development and virus transmission. *Front Physiol* 10:557. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00557>
- Karabowicz J, Długosz E, Baska P, Wiśniewski M (2022) Nematode orthologs of macrophage migration inhibitory factor (MIF) as modulators of the host immune response and potential therapeutic targets. *Pathogens* 11(2):258. <https://doi.org/10.3390/pathogens11020258>
- Khajuria C, Ivashuta S, Wiggins E, Flagel L et al (2018) Development and characterization of the first dsRNA-resistant insect population from western corn rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte. *PLoS One* 13:e0197059. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197059>
- Khan AM, Ashfaq M, Khan AA, Naseem et al (2018) Evaluation of potential RNA-interference-target genes to control cotton mealybug, *Phenacoccus solenopsis* (Hemiptera: Pseudococcidae). *Insect Sci* 25:778–786. <https://doi.org/10.1111/1744-7917.12455>
- Khan AM, Ashfaq M, Khan AA, Rasool A et al (2015) Inoculation of *Nicotiana tabacum* with recombinant potato virus X induces RNA interference in the solenopsis mealybug, *Phenacoccus solenopsis* Tinsley (Hemiptera: Pseudococcidae). *Biotechnol Lett* 37:2083–2090. <https://doi.org/10.1007/s10529-015-1880-7>
- Khan AM, Ashfaq M, Kiss Z, Khan AA et al. (2013) Use of recombinant tobacco mosaic virus to achieve RNA interference in plants against the citrus mealybug, *Planococcus citri* (Hemiptera: Pseudococcidae). *PLoS One* 8(9):e73657. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073657>
- Killiny N, Hajeri S, Tiwari S, Gowda S, Stelinski LL (2014) Double-stranded RNA uptake through topical application, mediates silencing of five CYP4 genes and suppresses insecticide resistance in *Diaphorina citri*. *PLoS one* 9(10):e110536. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110536>
- Konarev AV, Beaudoin F, Marsh J, Vilcova NA et al (2011) Characterization of a glutenin-specific serine proteinase of Sunn bug *Eurygaster integriceps* Put. *J Agric Food Chem* 59(6):2462–2470. <https://doi.org/10.1021/jf103867g>
- Konarev A, Dolgikh V, Senderskiy I, Konarev A, Kapustkina A, Lovegrove A (2019) Characterisation of proteolytic enzymes of *Eurygaster integriceps* Put. (Sunn bug), a major pest of cereals. *J Asia Pac Entomol* 22(1):379–385. <https://doi.org/10.1016/j.aspen.2019.02.001>
- Kostal V, Tollarova-Borovanska M (2009) The 70 kDa heat shock protein assists during the repair of chilling injury in the insect, *Pyrrhocoris apterus*. *PLoS One* 4:e4546. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004546>
- Kotwica-Rolinska J, Pivarciova L, Vaneckova H, Dolezel D (2017) The role of circadian clock genes in the photoperiodic timer of the linden bug *Pyrrhocoris apterus* during the nymphal stage. *Physiol Entomol* 42:266–273. <https://doi.org/10.1111/phen.12197>
- Kumar S, Nehra M, Dilbaghi N, Marrazza Get al (2019) Nano-based smart pesticide formulations: Emerging opportunities for agriculture. *J. Control. Release* 294:131–153. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.12.012>
- Kunieda T, Fujiyuki T, Kucharski R, Foret S, et al (2006) Carbohydrate metabolism genes and pathways in insects: insights from the honeybee genome. *Insect Mol Biol* 15(5):563–576. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2006.00677.x>
- Kunte N, McGraw E, Bell S, Held D, Avila LA (2020) Prospects, challenges and current status of RNAi through insect feeding. *Pest Manag Sci* 76(1):26–41. <https://doi.org/10.1002/ps.5588>
- Leonard SP, Powell JE, Perutka J, Geng P et al (2020) Engineered symbionts activate honey bee immunity and limit pathogens. *Science* 367:573–576. DOI: 10.1126/science.aax9039.
- Li H, Guan R, Guo H, Miao X (2015) New insights into an RNAi approach for plant defence against piercing-sucking and stem-borer insect pests. *Plant Cell Environ* 38(11):2277–2285. <https://doi.org/10.1111/pce.12546>
- Li X, Qu MJ, Zhang Y, Li JW, Liu TX (2018) Expression of neuropeptide F gene and its regulation of feeding behavior in the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. *Front Physiol* 9:87. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00087>
- Li Y, Park H, Smith TE, Moran NA (2019) Gene family evolution in the pea aphid based on chromosome-level genome assembly. *Mol Biol Evol* 36(10):2143–156. <https://doi.org/10.1093/molbev/msz138>
- Lisei-de-Sá ME, Rodrigues-Silva PL, Morgante CV, de Melo BP et al (2021) Pyramiding dsRNAs increases phytonematode tolerance in cotton plants. *Planta*. 254(6):1–4. <https://doi.org/10.1007/s00425-021-03776-0>
- Liu F, Yang B, Zhang A, Ding D, Wang G (2019) Plant-mediated RNAi for controlling *Apolygus lucorum*. *Front Plant Sci* 10:64. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00064>
- Liu FH, Kang ZW, Tan XL et al (2020) Physiology and defense responses of wheat to the infestation of different cereal aphids. *J Integr Agric* 19(6):1464–74. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(19\)62786-3](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(19)62786-3)
- Lou YH, Lu JB, Li DT, Ye YX et al (2019) Amelogenin domain-containing NiChP38 is necessary for normal ovulation in the brown planthopper. *Insect Mol Biol* 28(5):605–615. <https://doi.org/10.1111/imb.12576>

- Mamta B, Rajam MV (2017) RNAi technology: a new platform for crop pest control. *Physiol Mol Biol Plants* 23(3):487–501. <https://doi.org/10.1007/s12298-017-0443-x>
- Mano G, Goto SG (2022) Photoperiod controls insulin and juvenile hormone signaling pathways via the circadian clock in the bean bug *Riptortus pedestris* (Hemiptera: Alydidae). *Appl Entomol Zool* 57(4):363–377. <https://doi.org/10.1007/s13355-022-00795-5>
- Manzano-Marin A, Coeur d'acier A, Clamens AL, Orvain C (2020) Serial horizontal transfer of vitamin-biosynthetic genes enables the establishment of new nutritional symbionts in aphids' di-symbiotic systems. *ISME*, 14(1):259–2573. <https://doi.org/10.1038/s41396-019-0533-6>
- Mao J, Zeng F (2012) Feeding-based RNA interference of a gap gene is lethal to the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. *PLoS One*;7:e48718. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048718>.
- Matsumoto Y, Hattori M (2018) The green rice leafhopper, *Nephotettix cincticeps* (Hemiptera: Cicadellidae), salivary protein NcSP75 is a key effector for successful phloem ingestion. *PLoS One* 13(9): e0202492. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0202492>
- McAllan JW, Adams JB (1961) The significance of pectinase in plant penetration by aphids. *Can J Zool* 39(3):305–10. <https://doi.org/10.1139/z61-034>
- Mehlhorn S, Hunnekühl VS, Geibel S, Nauen R et al (2021) Establishing RNAi for basic research and pest control and identification of the most efficient target genes for pest control: a brief guide. *Front Zool* 18:60. <https://doi.org/10.1186/s12983-021-00444-7>
- Miller SC, Miyata K, Brown SJ, Tomoyasu Y (2012) Dissecting systemic RNA interference in the red flour beetle *Tribolium castaneum*: parameters affecting the efficiency of RNAi. *PLoS One* 7:e47431. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047431>.
- Mishra R, Arora AK, Jimenez J, Tavares CS (2022) Bacteria-derived pesticidal proteins active against hemipteran pests. *J Invertebr Pathol* 13:107834. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2022.107834>
- Mogilicherla K, Howell JL, Palli SR (2018) Improving RNAi in the brown marmorated stink bug: identification of target genes and reference genes for RT-qPCR. *Sci rep* 8(1):1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22035-z>
- Moriyama M and Fukatsu T (2022) Host's demand for essential amino acids is compensated by an extracellular bacterial symbiont in a hemipteran insect model. *Front Physiol* 13:1028409 <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.1028409>
- Mutti NS, Louis J, Pappan LK, Pappan K et al (2008) A protein from the salivary glands of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*, is essential in feeding on a host plant. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(29): 9965–9969. <https://doi.org/10.1073/pnas.0708958105>
- Mutti NS, Park Y, Reese JC, Reeck GR (2006) RNAi knockdown of a salivary transcript leading to lethality in the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. *J Insect Sci* 6:1–7. <https://doi.org/10.1673/031.006.3801>
- Nakabachi A (2015) Horizontal gene transfers in insects. *Curr Opin Insect Sci* 7:24–9. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2015.03.006>
- Naessens E, Dubreuil G, Giordanengo P, Baron OL et al (2015) secreted MIF cytokine enables aphid feeding and represses plant immune responses. *Curr Biol* 25(14):1898–903. DOI: 10.1016/j.cub.2015.05.047
- Nalam V, Louis J, Shah J. (2019) Plant defense against aphids, the pest extraordinaire. *Plant Sci* 279:96–107. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2018.04.027>
- Ni M, Ma W, Wang X, Gao M et al (2017) Next-generation transgenic cotton: pyramiding RNAi and Bt counters insect resistance. *Plant Biotechnol J* 15:1204–1213. <https://doi.org/10.1111/pbi.12709>
- Nikoh N, Nakabachi A (2009) Aphids acquired symbiotic genes via lateral gene transfer. *BMC Biol* 7: 12. <http://doi.org/10.1186/1741-7007-7-12>
- Niu J, Yang WJ, Tian Y, Fan JY et al (2019) Topical dsRNA delivery induces gene silencing and mortality in the pea aphid. *Pest Manag Sci* 75(11):2873–2881. <https://doi.org/10.1002/ps.5457>
- Oliveira DS, Brito NF, Franco TA, Moreira MF et al (2018) Functional characterization of odorant binding protein 27 (RproOBP27) from *Rhodnius prolixus* antennae. *Front Physiol* 9:1175. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01175>
- Oliver KM, Degnan PH, Burke GR, Moran NA (2010). Facultative symbionts in aphids and the horizontal transfer of ecologically important traits. *Annu Rev Entomol* 55:247–652 266. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-112408-085305>
- Omar MAA, Ao Y, Li M, He K et al (2019) The functional difference of eight chitinase genes between male and female of the cotton mealybug, *Phenacoccus solenopsis*. *Insect Mol Biol* 28:550–567. <https://doi.org/10.1111/imb.12572>
- O'Brien J, Hayder H, Zayed Y, Peng C (2018) Overview of microRNA biogenesis, mechanisms of actions, and circulation. *Front Endocrinol* 9:402. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00402>
- Paim RM, Araujo RN, Lehane MJ, Gontijo NF et al (2013) Long-term effects and parental RNAi in the blood feeder *Rhodnius prolixus* (Hemiptera; Reduviidae). *Insect Biochem Mol Biol* 43(11):1015–20. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2013.08.008>
- Paim RM, Nascimento BW, Nascimento AM, Pacheco DE et al (2017) Functional aspects of salivary nitric oxide synthase of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera, Reduviidae) and nitric oxide trafficking at the vector-host interface. *Sci Rep* 7(1):16036. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-16097-8>
- Parker BJ, Brisson JA (2019) A laterally transferred viral gene modifies aphid wing plasticity. *Curr Biol* 29(12):2098–2103. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.05.041>
- Peres AL, Coletta RD, Soares JS, Menossi M et al (2022) Gene Silencing Using Artificial miRNA in Sugarcane. *Trop Plant Biol.* 25:1–0. <https://doi.org/10.1007/s12042-022-09313-x>
- Perier JD, Cremonez PS, Champagne DE, Simmons AM, Riley DG (2022) Whiteflies at the intersection of polyphagy and insecticide resistance. *Ann Entomol Soc Am* 115(6):401–416. <https://doi.org/10.1093/aesa/saac008>
- Pridgeon JW, Zhao L, Becnel JJ, Strickman DA et al (2008) Topically applied *AaeIAP1* double-stranded RNA kills female adults of *Aedes aegypti*. *J Med Entomol*; 45:414–20. <http://doi.org/10.1093/jmedent/45.3.414>.
- Ran Z, Shi X, Han F, Li J et al (2018) Expressing microRNA bantam sponge drastically improves the insecticidal activity of baculovirus via increasing the level of ecdysteroid hormone in *Spodoptera exigua* larvae. *Front Microbiol* 9:1824. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01824>

- Rauf I, Asif M, Amin I, Naqvi RZ et al (2019) Silencing cathepsin L expression reduces *Myzus persicae* protein content and the nutritional value as prey for *Coccinella septempunctata*. *Insect Mol Biol* 28(6):785–797. <https://doi.org/10.1111/imb.12589>
- Rausch MA, Chougule NP, Deist BR, Bonning BC (2016) Modification of Cry4Aa toward Improved Toxin Processing in the Gut of the Pea Aphid, *Acyrtosiphon pisum*. *PLoS One* 11(5): e0155466. doi:10.1371/journal.pone.0155466
- Ray S, Casteel CL (2022) Effector-mediated plant–virus–vector interactions. *The Plant Cell* 34(5):1514–1531. <https://doi.org/10.1093/plcell/koac058>
- Rispe C, Legeai F, Nabity PD, Fernández R et al (2020) The genome sequence of the grape phylloxera provides insights into the evolution, adaptation, and invasion routes of an iconic pest. *BMC Biol* 18(1):1–25. <https://doi.org/10.1186/s12915-020-00820-5>
- Salcedo-Porras N, Guarneri A, Oliveira PL, Lowenberger C (2019) *Rhodnius prolixus*: Identification of missing components of the IMD immune signaling pathway and functional characterization of its role in eliminating bacteria. *PLoS One* 14(4):e0214794. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0214794>
- Sandstrom J, Moran N (1999) How nutritionally imbalanced is phloem sap for aphids? *Entomol Exp Appl* 91(1):203–210. <https://doi.org/10.1046/j.1570-7458.1999.00485.x>
- Saurabh S, Mishra M, Rai P, Pandey R (2021) Tiny Flies: A mighty pest that threatens agricultural productivity—a case for next-generation control strategies of whiteflies. *Insects* 12(7):585. <https://doi.org/10.3390/insects12070585>
- Saurabh S, Vidyarthi AS, Prasad D (2014). RNA interference: concept to reality in crop improvement. *Planta* 239 (3): 543–64. <https://doi.org/10.1007/s00425-013-2019-5>
- Schwab R, Ossowski S, Riester M, Warthmann N, Weigel D (2006) Highly specific gene silencing by artificial microRNAs in Arabidopsis. *Plant Cell* 18(5):1121–1133. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.039834>
- Semeraro L, Fletcher MJ, Malipatil MB, Constant J et al (2021) Revision of a unique Australian leafhopper genus *Stenopsoides* Evans (Hemiptera: Cicadellidae: Idiocerinae: Macropsini). *Zootaxa* 4999(2):117–131. <https://doi.org/10.11646/ZOOTAXA.4999.2.2>
- Shakesby AJ, Wallace IS, Isaacs HV, Pritchard J et al (2009) A water-specific aquaporin involved in aphid osmoregulation. *Insect Biochem Mol Biol* 39(1):1–10. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2008.08.008>
- Shang F, Niu J, Ding BY, Zhang Q, et al (2018) Vitellogenin and its receptor play essential roles in the development and reproduction of the brown citrus aphid, *Aphis (Toxoptera) citricidus*. *Insect Mol Biol* 27(2):221–233. <https://doi.org/10.1111/imb.12366>
- Shang F, Ding BY, Ye C, Yang L et al (2020) Evaluation of a cuticle protein gene as a potential RNAi target in aphids. *Pest Manag Sci* 76(1):134–140. <https://doi.org/10.1002/ps.5599>
- Shang F, Ding BY, Xiong Y, Dou W, Wei D, Jiang HB et al (2016) Differential expression of genes in the alate and apterous morphs of the brown citrus aphid, *Toxoptera citricida*. *Sci Rep* 6:srep32099. <https://doi.org/10.1038/srep32099>
- Shapoval NA, Nokkala S, Nokkala C, Kuffina GN et al (2021) The incidence of Wolbachia bacterial endosymbiont in bisexual and parthenogenetic populations of the Psyllid genus *Cacopsylla* (Hemiptera, Psylloidea). *Insects* 12(10):853. <https://doi.org/10.3390/insects12100853>
- Shelby EA, Moss JB, Andreason SA, Simmons AM et al (2020) Debugging: Strategies and considerations for efficient RNAi-mediated control of the whitefly *Bemisia tabaci*. *Insects* 11(11):723. <https://doi.org/10.3390/insects11110723>
- Shukla A, Upadhyay S, Mishra M, Saurabh SR et al (2016) Expression of an insecticidal fern protein in cotton protects against whitefly. *Nat Biotechnol* 34:1046–1051. <https://doi.org/10.1038/nbt.3665>
- Silva-Sanzana C, Estevez JM, Blanco-Herrera F (2020) Influence of cell wall polymers and their modifying enzymes during plant–aphid interactions. *J Exp Bot* 71(13):3854–3864. <https://doi.org/10.1093/jxb/erz550>
- Silver K, Cooper AM, Zhu KY (2021) Strategies for enhancing the efficiency of RNA interference in insects. *Pest Manag Sci* 77(6):2645–2658. <https://doi.org/10.1002/ps.6277>
- Singh IK, Singh S, Mogilicherla K, Shukla JN et al (2017) Comparative analysis of double-stranded RNA degradation and processing in insects. *Sci Rep* 7:17059. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17134-2>
- Singh S, Gupta M, Pandher S, Kaur G et al (2018) Selection of housekeeping genes and demonstration of RNAi in cotton leafhopper, *Amrasca biguttula biguttula* (Ishida). *PLoS One* 13:e0191116. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191116>
- Song N, Zhang H, Zhao T (2019) Insights into the phylogeny of Hemiptera from increased mitogenomic taxon sampling. *Mol Phylogenet Evol* 137:236–49. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2019.05.009>
- Sorensen JT (2009). Aphids. In: Resh VH, Cardé RT (eds) *Encyclopedia of Insects* (2 ed.). Academic Press. 27–31. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374144-8.00008-4>
- Soucy SM, Huang J, Gogarten JP (2015) Horizontal gene transfer: building the web of life. *Nat Rev Genet* 16(8):472–82. <https://doi.org/10.1038/nrg3962>
- Souza D, Christensen SA, Wu K, Buss L et al (2022) RNAi-induced knockdown of *white* gene in the southern green stink bug (*Nezara viridula* L.). *Sci Rep* 12:10396. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-14620-0>
- Sparks ME, Bansal R, Benoit JB, Blackburn MB et al (2020) Brown marmorated stink bug, *Halyomorpha halys* (Stål), genome: putative underpinnings of polyphagy, insecticide resistance potential and biology of a top worldwide pest. *BMC Genomics* 21(1):1–26. <https://doi.org/10.1186/s12864-020-6510-7>
- Sparks ME, Shelby KS, Kuhar D, Gundersen-Rindal DE (2014) Transcriptome of the invasive brown marmorated stink bug, *Halyomorpha halys* (Stål) (Heteroptera: Pentatomidae). *PLoS one*. Nov 11;9(11):e111646.
- Sugahara R, Minaba M, Jouraku A, Kotaki et al (2016) Characterization of two adenine nucleotide translocase paralogues in the stink bug, *Plautia stali*. *J Pestic Sci* 41:44–48. <https://doi.org/10.1584/jpestics.D15-080>
- Sun CX, Li ZX (2021). Biosynthesis of aphid alarm pheromone is modulated in response to starvation stress under regulation by the insulin, glycolysis and isoprenoid pathways. *J Insect Physiol*. 128:104174. <http://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2020.104174>.

- Sun Y, Sparks C, Jones H, Riley M et al (2019) Silencing an essential gene involved in infestation and digestion in grain aphid through plant-mediated RNA interference generates aphid-resistant wheat plants. *Plant Biotechnol J* 17(5):852. <http://doi.org/10.1111/pbi.13067>
- Sun ZJ, Li ZX (2018) The terpenoid backbone biosynthesis pathway directly affects the biosynthesis of alarm pheromone in the aphid. *Insect Mol Biol* 27(6):824–834. <https://doi.org/10.1111/imb.12521>
- Tamborindeguy C, Bereman MS, DeBlasio S, Igwe D et al (2013) Genomic and proteomic analysis of *Schizaphis graminum* reveals cyclophilin proteins are involved in the transmission of cereal yellow dwarf virus. *PLoS One* 8(8):e71620. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0071620>
- Tandon A, Singh SJ, Chaturvedi RK (2021) Nanomedicine against Alzheimer's and Parkinson's disease. *Curr Pharm Des* 27(12):1507–45. <https://doi.org/10.2174/1381612826666201021140904>
- Thairu MW, Skidmore IH, Bansal R, Nováková E et al (2017) Efficacy of RNA interference knockdown using aerosolized short interfering RNAs bound to nanoparticles in three diverse aphid species. *Insect Mol Biol* 26(3):356–368. <https://doi.org/10.1111/imb.12301>
- Thakur N, Munday JK, Upadhyay SK (2016) RNAi- Implications in entomological research and pest control. In: Abdurakhmonov, I.Y., Ed. RNA Interference Rijeka, Croatia: InTech. 341–369 <http://doi.org/10.5772/61814>
- Thompson MC, Feng H, Wuchty S, Wilson AC (2019) The green peach aphid gut contains host plant microRNAs identified by comprehensive annotation of *Brassica oleracea* small RNA data. *Sci Rep* 9:18904. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54488-1>
- Tian L, Zeng Y, Xie W, Wu Q (2019) Genome-wide identification and analysis of genes associated with RNA interference in *Bemisia tabaci*. *Pest Manag Sci* 75(11):3005–3014. <https://doi.org/10.1002/ps.5415>
- Tomoyasu Y, Miller SC, Tomita S, Schoppmeier M et al (2008) Exploring systemic RNA interference in insects: a genome-wide survey for RNAi genes in *Tribolium*. *Genome Biol* 9:R10. <https://doi.org/10.1186/gb-2008-9-1-r10>
- Tzin V, Yang X, Jing X, Zhang K et al (2015) RNA interference against gut osmoregulatory genes in phloem-feeding insects. *J Insect Physiol* 79:105–112. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2015.06.006>
- van Emden HF, Wild EA (2020) A fully defined artificial diet for *Myzus persicae* – the detailed technical manual. *Entomol Exp Appl* 168(6–7):582–6. <https://doi.org/10.1111/eea.12917>
- Vaucheret H, Chupeau Y (2012) Ingested plant miRNAs regulate gene expression in animals. *Cell research* 22(1):3–5. <https://doi.org/10.1038/cr.2011.164>
- Villarreal CA, González-González A, Alvarez-Baca JK, Villarreal P et al (2022) Genome sequencing of a predominant clonal lineage of the grain aphid *Sitobion avenae*. *Insect Biochem Mol Biol* 2022 143:103742. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.103742>
- Vogel E, Santos D, Mingels L, Verdonckt TW et al (2019) RNA interference in insects: protecting beneficials and controlling pests. *Front Physiol* 9:1912. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01912>
- Walker WB, Allen ML (2011) RNA interference-mediated knockdown of IAP in *Lygus lineolaris* induces mortality in adult and pre-adult life stages. *Entomol Exp Appl* 138:83–92. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.2010.01078.x>
- Wang G, Gou Y, Guo S, Zhou JJ, Liu C (2021) RNA interference of trehalose-6-phosphate synthase and trehalase genes regulates chitin metabolism in two color morphs of *Acyrtosiphon pisum* Harris. *Sci Rep* 11:1–12. <http://doi.org/10.1038/s41598-020-80277-2>
- Wang K, Peng Y, Pu J, Fu W et al (2016) Variation in RNAi efficacy among insect species is attributable to dsRNA degradation *in vivo*. *Insect Biochem Mol Biol* 77:1–9. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2016.07.007>
- Wang SY, Li BL, Zhang DY (2019) NICYP4G76 and NICYP4G115 modulate susceptibility to desiccation and insecticide penetration through affecting cuticular hydrocarbon biosynthesis in *Nilaparvata lugens* (Hemiptera: Delphacidae). *Front Physiol* 10. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00913>
- Wang W, Wan P, Lai F, Zhu T, Fu Q (2018) Double-stranded RNA targeting calmodulin reveals a potential target for pest management of *Nilaparvata lugens*. *Pest Manag Sci* 74:1711–1719. <https://doi.org/10.1002/ps.4865>
- Waqas MS, Shi Z, Yi TC, Xiao R et al (2021) Biology, ecology, and management of cotton mealybug *Phenacoccus solenopsis* Tinsley (Hemiptera: Pseudococcidae). *Pest Manag Sci* (12):5321–5333. <https://doi.org/10.1002/ps.6565>
- Waris MI, Younas A, Ul Qamar MT, Hao L et al (2018) Silencing of chemosensory protein gene NlugCSP8 by RNAi induces declining behavioral responses of *Nilaparvata lugens*. *Front Physiol* 9:379. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00379>
- Whitten MMA, Facey PD, Del Sol R, Fernández-Martínez LT et al (2016) Symbiont-mediated RNA interference in insects. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 283:20160042. <https://doi.org/10.1098/rspb.2016.0042>
- Whyard S, Singh AD, Wong S (2009) Ingested double-stranded RNAs can act as species-specific insecticides. *Insect Biochem Mol Biol* 39(11):824–832. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2009.09.007>
- Will T, Vilcinskis A (2015) The structural sheath protein of aphids is required for phloem feeding. *Insect Biochem Mol Biol* 57:34–40. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2014.12.005>
- Winston WM, Sutherlin M, Wright AJ, Feinberg EH, Hunter CP (2007) *Caenorhabditis elegans* SID-2 is required for environmental RNA interference. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:10565–10570. <https://doi.org/10.1073/pnas.0611282104>
- Wu Z, Yang L, He Q, Zhou S (2021) Regulatory mechanisms of vitellogenesis in insects. *Front Cell Dev Biol* 8:593613. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.593613>
- Wybouw N, Pauchet Y, Heckel DG, Van Leeuwen T (2016) Horizontal gene transfer contributes to the evolution of arthropod herbivory. *Genome Biol Evo* 8(6):1785–1801. <https://doi.org/10.1093/gbe/evw119>
- Xiao D, Lu YH, Shang Q, Song DL, Gao X (2014) Gene silencing of two acetylcholinesterases reveals their cholinergic and non-cholinergic functions in *Rhopalosiphum padi* and *Sitobion avenae*. *Pest Manag Sci* 71:523–530. <https://doi.org/10.1002/ps.3800>
- Xu HJ, Chen T, Ma XF, Xue J et al (2013) Genome-wide screening for components of small interfering RNA

- (siRNA) and micro-RNA (miRNA) pathways in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Hemiptera: Delphacidae). *Insect Mol Biol* 22:635–647. <https://doi.org/10.1111/imb.12051>
- Xu HX, Qian LX, Wang XW, Shao RX (2019a) A salivary effector enables whitefly to feed on host plants by eliciting salicylic acid-signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 116(2):490–495. <https://doi.org/10.1073/pnas.1714990116>
- Xu L, Duan X, Lv Y, Zhang X et al (2014) Silencing of an aphid carboxylesterase gene by use of plant-mediated RNAi impairs *Sitobion avenae* tolerance of Phoxim insecticides. *Transgenic Res* 23(2):389–396. <https://doi.org/10.1007/s11248-013-9765-9>
- Xu L, Hou Q, Zhao Y, Lu L et al (2017) Silencing of a lipase maturation factor 2 like gene by wheat-mediated RNAi reduces the survivability and reproductive capacity of the grain aphid, *Sitobion avenae*. *Arch Insect Biochem Physiol* 95(3):e21392. <https://doi.org/10.1002/arch.21392>
- Xu P, Lu B, Liu J, Chao J, Donkersley P, Holdbrook R, Lu Y (2019b) Duplication and expression of horizontally transferred polygalacturonase genes is associated with host range expansion of mirid bugs. *BMC Evol Biol* 19(1):1–9. <https://doi.org/10.1186/s12862-019-1351-1>
- Yates AD, Michel A (2018) Mechanisms of aphid adaptation to host plant resistance. *Curr Opin Insect Sci* 26:41–9. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2018.01.003>
- Yates-Stewart AD, Daron J, Wijeratne S, Shahid S et al (2020) Soybean aphids adapted to host-plant resistance by down regulating putative effectors and up regulating transposable elements. *Insect Biochem Mol Biol* 121:103363. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2020.103363>
- Ye C, Hu XS, Wang ZW, Wei D et al (2021) Involvement of clathrin-dependent endocytosis in cellular dsRNA uptake in aphids. *Insect Biochem Mol Biol* 132:103557. <http://doi.org/10.1016/j.ibmb.2021.103557>
- Ye C, Jiang YD, An X, Yang L et al (2019) Effects of RNAi-based silencing of chitin synthase gene on moulting and fecundity in pea aphids (*Acyrtosiphon pisum*) *Sci Rep* 9:1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39837-4>
- Yoon JS, Tian HG, McMullen II JG, Chung SH et al (2020) Candidate genetic determinants of intraspecific variation in pea aphid susceptibility to RNA interference. *Insect Biochem Mol Biol* 123:103408. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2020.103408>
- Yu N, Christiaens O, Liu J, Niu J et al (2013) Delivery of dsRNA for RNAi in insects: An overview and future directions. *Insect Sci* 20:4–14. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7917.2012.01534.x>
- Yu XD, Liu ZC, Huang SL, Chen ZQ et al. (2016). RNAi-mediated plant protection against aphids. *Pest Management Science*, 72(6):1090–1098. <http://doi.org/doi:10.1002/ps.4258>
- Zhang BZ, Ma KS, Liu JJ, Lu LY et al (2019) Differential expression of genes in greenbug (*Schizaphis graminum* Rondani) treated by imidacloprid and RNA interference. *Pest Manag Sci* 75(6):1726–1733. <https://doi.org/10.1002/ps.5293>
- Zhang H, Li HC, Miao XX (2013) Feasibility, limitation and possible solutions of RNAi-based technology for insect pest control. *Insect Sci* 20:15–30. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7917.2012.01513.x>
- Zhang J, Khan SA, Hasse C, Ruf S et al (2015) Full crop protection from an insect pest by expression of long double-stranded RNAs in plastids. *Science* 347(6225):991–994. <http://doi.org/10.1126/science.1261680>
- Zhang J, Li H, Zhong X, Tian J et al (2022a) RNA-Interference-Mediated Aphid Control in Crop Plants: A Review. *Agriculture* 12(12):2108. <https://doi.org/10.3390/agriculture12122108>
- Zhang Y, Jia FA, Sun JR, Chen JL (2015) Cloning and RNA interference analysis of the salivary protein C002 gene in *Schizaphis graminum*. *J Integr Agric* 14(4):698–705. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(14\)60822-4](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(14)60822-4)
- Zhang Y, Liu X, Francis F, Xie H et al (2022b) The salivary effector protein Sg2204 in the greenbug *Schizaphis graminum* suppresses wheat defence and is essential for enabling aphid feeding on host plants. *Plant Biotechnol J* 20(11):2187–2201. <http://doi.org/10.1111/pbi.13900>
- Zhang Y, Liu X, Fu Y, Crespo-Herrera L et al (2022c) Salivary effector Sm9723 of grain aphid *Sitobion miscanthi* suppresses plant defense and is essential for aphid survival on wheat. *Int J Mol Sci* 23(13):6909. <https://doi.org/10.3390/ijms23136909>
- Zheng Y, Hu Y, Yan S, Zhou H et al (2019) A polymer/detergent formulation improves dsRNA penetration through the body wall and RNAi-induced mortality in the soybean aphid *Aphis glycines*. *Pest Manag Sci* 75(7):1993–1999. <https://doi.org/10.1002/ps.5313>
- Zhao Y, Cong L, Lukiw WJ (2018) Plant and animal microRNAs (miRNAs) and their potential for inter-kingdom communication. *Cell Mol Neurobiol* 38:133–140. <https://doi.org/10.1007/s10571-017-0547-4>
- Zust T, Agrawal A. A. (2016). Mechanisms and evolution of plant resistance to aphids. *Nat. Plants* 2, 16206. <http://doi.org/10.1038/nplants.2015.206>
- Zyla D, Homan A, Wegierek P (2017) Polyphyly of the extinct family Oviparosiphidae and its implications for inferring aphid evolution (Hemiptera, Sternorrhyncha). *PLoS One* 12(4):e0174791. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0174791>

Translation of Russian References

- Dolgikh VV, Senderskii IV, Konarev AV (2014) Production and properties of recombinant glutenin-hydrolyzing proteinases from *Eurygaster integriceps* Put. *Appl Biochem Microbiol* 50:433–440. <https://doi.org/10.1134/S0003683814040048>
- Zhuravlyov V, Dolgikh V, Timofeev S, Gannibal F (2022) RNA interference method in plant protection against insect pests. *Plant Protection News* 105(1): 28–39. <https://doi.org/10.31993/2308-6459-2022-105-1-15219> (In Russian)
- Karpun NN, Borisov BA, Zhuravleva EN, Borisova IP et al (2022) [Range expansion and increasing damage potential of phytophagous shield bugs (Heteroptera: Pentatomidae) (review)] *Sel'skokhozyaistvennaya biologiya* 57(3):542–554. <https://doi.org/10.15389/agrobiol.2022.3.542rus>
- Maksimov IV, Shein MY, Burkhanova GF (2021) RNA interference in plant defense systems. *Russian Journal of*

- Plant Physiology 68(4):613–625. <https://doi.org/10.1134/S1021443721030134>
- Radchenko EE (2017) Aphid resistance in potato. *Vavilov Journal of Genetics and Breeding* 21(1):74–82. <https://doi.org/10.18699/VJ17.225> (In Russian)
- Plant Protection News, 2023, 106(1), p. 26–48
- OECD+WoS: 1.06+IY (Entomology) <https://doi.org/10.31993/2308-6459-2023-106-1-15625>
- S.Yu. Sinev (2013) [System of the class Insecta: an overview of modern concepts]. *Trudy Zoologicheskogo instituta RAN* 317(S2):155–173. https://elibrary.ru/download/elibrary_23150304_95801522.pdf (In Russian)

Full-text review

RNA INTERFERENCE IN THE STUDY OF GENE FUNCTIONS IN APHIDS AND OTHER HEMIPTERANS AND THE FIGHT AGAINST THEIR HARMFUL REPRESENTATIVES

A.V. Konarev

*All-Russian Institute of Plant Protection, St. Petersburg, Russia**e-mail: alv-konarev@yandex.ru*

RNA interference (RNAi) is an important mechanism that protects cells of eukaryotic organisms from foreign genetic information and regulates physiological processes. Discovery of RNAi and development of the methods for targeted suppression of the expression of individual genes have opened up wide opportunities for elucidating gene functions and solving many problems in biology, medicine, and plant protection. This approach can contribute to the development of new effective, highly specific, and environmentally safe ways to control harmful insects. Several examples of the practical use of RNAi for combating chewing pests have been already reported. Due to their biology, phloem-feeding, as well as the ways of delivering genetic constructs into the body, RNAi in insects with piercing-sucking mouthparts – aphids, bugs, and other hemipterans – deserves separate consideration. This review discusses the criteria for selecting target genes and the issues of their functional activity solved by RNAi, methods for delivering double-stranded and small RNAs to organisms of various Hemiptera, the non-target effects of RNAi and the ways to prevent them, as well as possible practical outcomes of using this approach to control hemipteran pests of agricultural plants and vectors of dangerous human and animal diseases.

Keywords: Hemiptera, aphids, RNA interference, gene silencing, pests, plant protection, disease vectors

*Submitted: 23.01.2023**Accepted: 23.03.2023*