



李琳红, 李彤, 巩中军, 蒋月丽, 段云, 武予清, 梁沛, 苗进. 转 *miR-34-5p* 玉米的构建及其对草地贪夜蛾幼虫的毒力评价 [J]. 环境昆虫学报, 2026, 48 (2): 353-361. LI Lin-Hong, LI Tong, GONG Zhong-Jun, JIANG Yue-Li, DUAN Yun, WU Yu-Qing, LIANG Pei, MIAO Jin. Construction of *miR-34-5p* maize and its toxicity evaluation against *Spodoptera frugiperda* larvae [J]. Journal of Environmental Entomology, 2026, 48 (2): 353-361.

## 转 *miR-34-5p* 玉米的构建及其对草地贪夜蛾幼虫的毒力评价

李琳红<sup>1</sup>, 李彤<sup>1</sup>, 巩中军<sup>1</sup>, 蒋月丽<sup>1</sup>, 段云<sup>1</sup>, 武予清<sup>1</sup>, 梁沛<sup>2\*</sup>, 苗进<sup>1\*</sup>  
(1. 河南省农业科学院植物保护研究所, 郑州 450000; 2. 中国农业大学, 北京 100193)

**摘要:**【目的】草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda* 是一种繁殖能力强、危害范围广的重要农业害虫, 且已对多种杀虫剂产生了抗性, 亟需开发新型绿色防控技术。【方法】前期研究发现, 过表达或抑制鳞翅目昆虫的 *miR-34-5p*, 可显著提高草地贪夜蛾等多种鳞翅目害虫的死亡率, 为进一步评价 *miR-34-5p* 在害虫防治中的应用潜力, 本研究构建了表达 *miR-34-5p* 的转基因玉米, 草地贪夜蛾取食该玉米 96 h 后, 草地贪夜蛾体内 *miR-34-5p* 的表达量上调了 2.5 倍, 其靶标基因蜕皮激素受体 *SfEcR* 的表达量显著降低了 45.5%。【结果】生物测定结果表明, 与取食野生型玉米相比, 取食转 *miR-34-5p* 玉米的草地贪夜蛾累积死亡率显著升高了 25.0%~40.0%。同时, 存活幼虫的生长发育严重受阻, 繁殖力显著降低。【结论】本研究证实了基于昆虫 miRNA 的转基因作物对草地贪夜蛾具有良好的防治效果, 为开发基于 miRNA 的绿色害虫防治策略提供了理论基础和技术支撑。

**关键词:** 草地贪夜蛾; *miR-34-5p*; 转基因玉米; RNA 干扰; 害虫防治

中图分类号: Q968.1; Q963

文献标识码: A

文章编号: 1674-0858 (2026) 02-0353-09

### Construction of *miR-34-5p* maize and its toxicity evaluation against *Spodoptera frugiperda* larvae

LI Lin-Hong<sup>1</sup>, LI Tong<sup>1</sup>, GONG Zhong-Jun<sup>1</sup>, JIANG Yue-Li<sup>1</sup>, DUAN Yun<sup>1</sup>, WU Yu-Qing<sup>1</sup>, LIANG Pei<sup>2\*</sup>, MIAO Jin<sup>1\*</sup> (1. Institute of Plant Protection, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450000; 2. China Agricultural University, Beijing 100193)

**Abstract:** 【Aim】 The fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*, is a major agricultural pest with high reproductive potential and poses a significant threat to a wide range of crops. Currently, it has developed resistance to multiple insecticides. Therefore, alternative green control strategies are urgently needed. 【Methods】 Previous research revealed that overexpression or inhibition of microRNA, *miR-34-5p*, resulted in high mortality in multiple lepidopteran pests such as *Spodoptera frugiperda*. To further evaluate the potential application of *miR-34-5p* in pest control, we constructed genetically modified maize expressing *miR-34-5p*. After the fall armyworm fed on this maize for 96 hours, the expression level of *miR-34-5p* significantly increased by 2.5 fold, and the expression level of its target gene, the ecdysteroid

基金项目: 国家自然科学基金 (32302347); 河南省农业科学院自主创新项目 (2025ZC56); 河南省农业科学院优秀青年科技基金 (2026YQ08); 2025年度河南省重大科技专项 (251100110300); 博士科研启动费项目 (2026BX44); 河南省农业科学院科技创新团队专项 (2024TD18); 河南省重点研发与推广专项 (262102110158)

作者简介: 李琳红, 女, 博士, 助理研究员, 从事昆虫毒理学和 RNA 农药方面的研究, E-mail: lilinhong2015@163.com

\*共同通讯作者: 梁沛, 男, 博士, 教授, 从事昆虫毒理学方面的研究, E-mail: liangcau@cau.edu.cn; 苗进, 男, 博士, 研究员, 从事昆虫生态学方面的研究, E-mail: miaojin1977@163.com

收稿日期 Received: 2025-08-26; 修回日期 Revision received: 2026-02-07; 接受日期 Accepted: 2026-02-10

receptor *SfEcR*, significantly decreased by 45.5%. **【Results】** Bioassay results demonstrated that the cumulative mortality of *S. frugiperda* fed on *miR-34-5p* transgenic maize were significantly increased by 25.0%~40.0%, compared with that of larvae fed on wild-type maize. Surviving larvae exhibited significant developmental defects and low fecundity. **【Conclusion】** These results indicate that insect microRNA-based transgenic crops exhibit promising control efficacy against *S. frugiperda*, which provides a theoretical basis and technical support for the development of miRNA-based green pest control strategies.

**Key words:** *Spodoptera frugiperda*; *miR-34-5p*; genetically modified maize; RNA interference; pest control

草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda* 属鳞翅目 Lepidoptera 夜蛾科 Noctuidae 灰翅夜蛾属 *Spodoptera*, 是一种重要的农业害虫, 具有强大的繁殖力、破坏力和迁飞能力。自入侵我国以来, 主要通过氯虫苯甲酰胺在内的化学杀虫剂进行防治, 但杀虫剂持续、大量的使用加速了抗药性的发展, 目前该虫已经对多种杀虫剂产生了抗药性 (梁沛等, 2020; Wang *et al.*, 2022b; Gao *et al.*, 2023), 亟需开发新型绿色防控技术。

基于 RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 的转基因植物在害虫绿色防治领域具有很大的潜力。20 世纪初, 有研究发现在玉米中表达玉米根萤叶甲 *Diabrotica virgifera virgifera* 的 *V-ATPaseA* 基因的双链 RNA (*dsV-ATPaseA*) 能够显著抑制玉米根萤叶甲的生长发育, 提高其死亡率, 大大降低了其对转基因玉米植株的危害 (Baum *et al.*, 2007)。随后, 表达 dsRNA 的转基因作物防治害虫的案例越来越多, 例如, 转基因番茄中表达烟粉虱 *Bemisia tabaci* 基因组中的一个植物特异性水平转移基因 *BtPMT1* 的 dsRNA, 烟粉虱取食后最终死亡率几乎达到 100%, 显著降低了烟粉虱对番茄的为害 (Xia *et al.*, 2021)。二化螟 *Chilo suppressali* 取食表达 Fatty acyl-CoA reductase 的 dsRNA (*dsFAR*) 水稻后死亡率达 80% 以上 (Sun *et al.*, 2022)。除了一价的转基因抗虫植物, 二价及多价的转基因抗虫植物也有了新的进展, 比如在表达苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*, Bt) 的 *cry1Ca* 水稻中转入靶向二化螟 *p38* 基因的 dsRNA, 能大大提高 *cry1Ca* 水稻对二化螟的抗性 (Wu *et al.*, 2023)。最新研究发现, 采用错配核苷酸间隔纠错的 dsRNA 设计理念, 可以有效地拓展植物介导 RNAi 技术的杀虫谱, 从而达到“一箭双雕”的害虫防治模式 (Dong *et al.*, 2024)。微小 RNA (microRNA, miRNA) 也是 RNAi 的重要组成部分, 在害虫防治方面同样具有巨大的潜力, 然而, 与

dsRNA 相比, 目前基于 miRNA 的转基因作物在害虫防治领域的研究仍处于起步阶段。

miRNAs 是一类长度约 22 个核苷酸的非编码单链小 RNA 分子 (Behura, 2007), 它通过碱基互补配对与靶基因 mRNA 结合从而降解 mRNA 或抑制其翻译 (Lucas and Raikhel, 2013)。miRNAs 作为调节基因表达的关键因子, 几乎参与昆虫所有生理和生化过程, 包括蜕皮和变态 (Lim *et al.*, 2018; Song and Zhou, 2020)、繁殖 (Song *et al.*, 2019)、免疫 (Fullaondo and Lee, 2012; Wang *et al.*, 2022a)、翅的发育 (Shang *et al.*, 2020) 以及抗药性 (Zhu *et al.*, 2020; Zhu *et al.*, 2021) 等, 对昆虫的生长和发育至关重要。因此, 特定 miRNAs 的异常表达往往会使昆虫生长发育严重受阻, 甚至死亡。前期通过 miRNA 靶标预测发现 *miR-34-5p* 可能靶向鳞翅目昆虫生长发育关键基因蜕皮激素受体 (Ecdysone receptor, *EcR*), 且 *miR-34-5p* 在 *EcR* 上的靶标结合位点序列高度保守, 暗示了一种昆虫的 *miR-34-5p* 可能同时调控多种鳞翅目害虫 *EcR* 的表达, 具有实现一种 miRNA 同时防治多种鳞翅目害虫的基本条件。通过试验证明, *miR-34-5p* 通过负调控蜕皮激素受体 *EcR* 的表达参与鳞翅目昆虫的生长发育, 注射或饲喂 *miR-34-5p* 的类似物或抑制剂后, 鳞翅目昆虫的 *miR-34-5p* 表达异常, 最终导致鳞翅目害虫的死亡率显著升高、繁殖力大大降低, 种群量降低 80% 以上 (Li *et al.*, 2022)。此外, 在寄主植物上喷施大肠杆菌表达的人工 *miR-34-5p* (*amiRNA-34*), 对小菜蛾 *Plutella xylostella*、草地贪夜蛾和甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* 幼虫均具有良好的防治效果, 证实了 *miR-34-5p* 在多种鳞翅目害虫绿色防控中的潜能 (Li *et al.*, 2024)。

为了进一步拓宽 *miR-34-5p* 在害虫防治中的应用途径, 本研究成功构建了表达 *miR-34-5p* 转基因玉米, 分析了取食 *miR-34-5p* 转基因玉米对

草地贪夜蛾生长发育关键基因 *EcR* 表达量的调控作用，明确了对其存活率，生长发育和繁殖力的影响，系统评估了 *miR-34-5p* 转基因玉米在草地贪夜蛾防控中的潜在作用。该研究不仅丰富了基于 miRNA 的害虫防控策略，还为 RNAi 技术在转基因抗虫作物中的应用提供了新的理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试昆虫和玉米植株

草地贪夜蛾幼虫在中国科学院动物研究所生物农药中试基地购买。草地贪夜蛾用人工饲料饲养 (Pinto *et al.*, 2019)，幼虫到 3 龄后用 25 mL 塑料杯 (3 × 3 × 4 cm) 单头饲养，避免自残，成虫用 10% 蜂蜜溶液饲喂。昆虫饲养的环境条件为温度 (26 ± 1) °C，相对湿度为 60%~70%，光暗周期为 16 h : 8 h。

野生型 (Wild type, WT) 玉米 *Zea mays* L. 种子由伯远生物技术有限公司 (中国, 武汉) 提供。玉米种子用清水泡 8 h 后，倒掉多余的水，用湿布覆盖，在 25°C 环境下催芽，出芽之后撒到直径 10 cm 的花盆中，覆上薄薄的一层土，定期观察生长情况。玉米的生长环境条件为：温度 (25 ± 1) °C，相对湿度为 60%~80%，光暗周期为 16 h : 8 h。

### 1.2 构建 *miR-34-5p* 转基因玉米

为了使 *miR-34-5p* 在玉米中正常表达，选用植物的 miRNA 前体 *ath-miR319a* 作为骨架 (Schwab *et al.*, 2006; Yogindran and Rajam, 2021)，将 *miR-34-5p* (5'-TGGCAGTGTGGTTAGCTGGTTGT-3') 和 *miR-34-3p* (5'-ACCACCAGCTAACCAGACTGCCA-3') 替代 *ath-miR319a* 的成熟序列以构建 *ath-miR319a-34* (图 1)，然后将 *ath-miR319a-34* 构建到植物表达载体 pBWA (V) BU

(启动子是 CaMV 35S；终止子是 Nos) 中获得载体 pBWA (V) BU-*miR319a-34* 来表达 *miR-34-5p* (Sun *et al.*, 2022)。重组质粒 pBWA (V) BU-*miR319a-34* 的构建以及玉米的遗传转化委托给伯远生物技术有限公司 (中国, 武汉)。通过农杆菌转化法，将表达载体转化到野生型玉米 B73 中，首先将侵染完成的幼胚连同菌液一起倒入共培养基中，于 25°C 暗培养箱中培养 2~3 d，然后接种于诱导培养基上，28°C 培养箱中暗培养 7~10 d，其次，将诱导好的愈伤接种至筛选培养基上，28°C 暗培养 2 周进行筛选培养，将预分化的胚性愈伤接种于分化培养基上，置于 25°C 光照培养箱进行培养，直到分化出幼苗，最后，将分化好的幼苗转移到生根培养基中，25°C 光照培养，直到根系发育完全后移栽至温室基质内 (图 2)。

```

gagctcACAAACACACGCTCGGACGCATATTACACATGTTTCATACACTTAATACTC
GCTGTTTTGAATTGATGTTTTAGGAATATATATGTAGAACCACCAGCTAACGAC
ACTGCCATCACAGGTCGTGATGATGATTCAATTAGCTCCGACTCATTCAATCAAAAT
ACCAGTGCGCCAAAATCAAAGTAGACTCGTTAAATGAATGAATGATCGGGTAGAC
AAATTGGATCATTGATCTCTTTGATGGCAGTGTGGTTAGCTGGTTGTCTCT
CTTTGTATTCCAATTTCTTGATTAATCTTCTGCACAAAAACATGCTTGATCCAC
TAAGTGACATATATGCTGCCCTCGTATATATAGTTCTGGTAAATAACATTTGGGT
TTATCTTTAATTAAGGCATCGCCATGggatcc
  
```

图 1 *ath-mir319a-34* 的序列

Fig.1 Sequence of *ath-mir319a-34*

注：ath-miR319a 的天然成熟 miRNA 双链体被 *miR-34-5p* 和 *miR-34-3p* 取代。用红色和绿色标记的核苷酸分别表示 *miR-34-5p* 和 *miR-34-3p* 的序列。蓝色和橙色标记的核苷酸分别是 *SacI* 和 *BamHI* 的限制性内切酶切割位点。Note: The native mature miRNA duplex of *ath-miR319a* was replaced by *miR-34-5p* and *miR-34-3p*. The nucleotides marked in red and green represent the sequence of *miR-34-5p* and *miR-34-3p*, respectively. The nucleotides marked in blue and orange is restriction enzyme cleavage sites for *SacI* and *BamHI*, respectively.

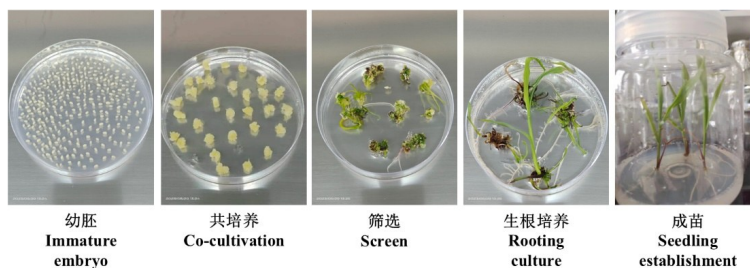


图 2 构建表达 *miR-34-5p* 的转基因玉米的过程

Fig. 2 Construction process of genetically modified maize expressing *miR-34-5p*

### 1.3 T0代阳性转基因玉米的筛选

首先从野生型 (WT) 和 T0 代玉米叶片中提取玉米基因组 DNA, 以基因组 DNA 为模板, PCR 扩增报告基因 *basta* 基因, 所用引物见表 1, 通过琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物, 从而筛选出 T0 代阳性玉米植株, 同时以野生型玉米和双蒸馏水作为阴性对照。

### 1.4 总 RNA 提取和荧光定量 PCR

按照试剂盒的说明, 用 TRIzol 试剂提取草地贪夜蛾幼虫的总 RNA; 用植物总 RNA 提取试剂盒提取玉米叶片的总 RNA, 具体步骤参照试剂盒的说明书。对于 mRNA 的反转录, 按照 Takara 公司的 Primescript RT reagent kit with gDNA Eraser 反转录试剂盒说明书进行; 对于 miRNA 的反转录 (茎

环法和加尾法), 分别使用生工的 miRNA 第一链 cDNA 合成 (茎环法和加尾法) 试剂盒, 根据说明书进行操作, 茎环法反转录用的引物见表 1。

从 NCBI 网站 GenBank 中获得草地贪夜蛾蜕皮激素受体 *EcR* 的基因序列, 利用 Primer Premier5 软件设计荧光定量引物, 用 ABI 7500 RealTime PCR 系统进行荧光定量检测, 并设置三个重复。其中转基因玉米不同植株中 *miR-34-5p* 的表达量以玉米的 *5SrRNA* 为内参; 草地贪夜蛾取食转基因玉米后 *EcR* 和 *miR-34-5p* 相对表达量, 分别以 ribosomal protein L10 (Rpl10) 和 U6 snRNA (小核 RNA) 为内参, 引物序列详见表 1, 采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  方法计算基因的相对表达量, 具体参考 (Livak and Schmittgen, 2001)。

表 1 用于 PCR 和 qRT-PCR 的定量引物

Table 1 Primers used for PCR and qRT-PCR analysis

用途 Purpose	物种 Species	引物名称 Primer name	引物序列 (5'-3') Primer sequences
Stem-loop RT-qPCR	草地贪夜蛾 <i>S. frugiperda</i>	RT-primer <i>miR-34-5p</i>	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCCGACTGGATACGACACAACC
		<i>miR-34-5p</i> -F	GCGTGGCAGTGTGGTTAGCT
		<i>miR-34-5p</i> -R	AGTGCAGGGTCCGAGGTATT
	玉米 <i>Z. mays</i>	RT-primer <i>zma-5SrRNA</i>	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCCGACTGGATACGAGAGCTATA
		<i>zma-q5SrRNA</i> -F	CGGGCGCGATCCCATTCGGACC
		<i>zma-q5SrRNA</i> -R	GTGCAGGGTCCGAGGT
RT-qPCR	草地贪夜蛾 <i>S. frugiperda</i>	<i>SfEcR</i> -F	TACGGACCCTACAGCCCAAAT
		<i>SfEcR</i> -R	TCGCCGACAGCAGACATA
		<i>SfRpl10</i> -F	GTGTCTGACGAATACGAGCAG
		<i>SfRpl10</i> -R	AAGCACCACGCATTCCAGT
Tailing RT-qPCR	草地贪夜蛾 <i>S. frugiperda</i>	<i>miR-34</i> -F	TGGCAGTGTGGTTAGCTGGTTGT
		U6-F	由 miRNA 第一链 cDNA 合成试剂盒 (加尾法) 提供 Provided by miRNA First Strand cDNA Synthesis (Tailing Reaction)
		R	由 miRNA 第一链 cDNA 合成试剂盒 (加尾法) 提供 Provided by miRNA First Strand cDNA Synthesis (Tailing Reaction)
PCR (report gene)	玉米 <i>Z. mays</i>	<i>basta</i> -347F	AGGCTGAAGTCCAGCTGCCAG
		<i>basta</i> -347R	GAGCGCTATCCCTGGCTCGTC

### 1.5 表达 *miR-34-5p* 的 T1 代转基因玉米对草地贪夜蛾的毒力

通过 qPCR 检测 T1 代玉米不同植株中 *miR-34-5p* 相对表达量, 选择 *miR-34-5p* 表达较高的植株 Z#11、Z#14 和 Z#24 进行盆栽生测实验。在每个花盆中种 9 棵玉米, 7 d 后接入 40 头 1 龄草地贪夜蛾幼虫, 以野生型玉米作为对照组, 重复 3 次。每天观察并记录玉米植株被损害情况和害虫的生长发育情况, 接虫后第 12 天统计幼虫的死亡率。

### 1.6 数据分析

所有数据均以平均值±标准误表示, 通过配对样本 *t* 检验分析草地贪夜蛾取食表达 *miR-34-5p* 的玉米后 *miR-34-5p* 和 *EcR* 表达量差异, 不同玉米植株中 *miR-34-5p* 的相对表达量以及取食表达 *miR-34-5p* 的玉米后草地贪夜蛾死亡率、体长和体重等生长发育参数的统计均通过单因素方差分析 (ANOVA) 结合 Tukey 多重比较进行分析, 统计分

析使用软件 DPS 进行。

## 2 结果与分析

### 2.1 表达 *miR-34-5p* 玉米植株的鉴定

为了检测 *miR-34-5p* 序列是否成功转入玉米基因组中, 以 23 个 T0 代玉米转化株的 DNA 为模板, 以 *basta* 为报告基因进行 PCR 扩增, 结果如图 3-A, 共有 20 株阳性玉米。为了进一步筛选 *miR-34-5p* 高表达的转基因玉米植株, 以 T1 代转基因玉米的 RNA 为模板, qPCR 检测不同玉米植株中 *miR-34-5p* 的表达量, 结果如图 3-B, 在 20 个 T1 代玉米中, Z#12、Z#14、Z#24 中 *miR-34-5p* 的相对表达显著高于其他植株 ( $F_{18,37}=109.217$ ,  $P<0.001$ ), 因此将以玉米植株 Z#12、Z#14、Z#24 为代表进行后续毒力测定实验。

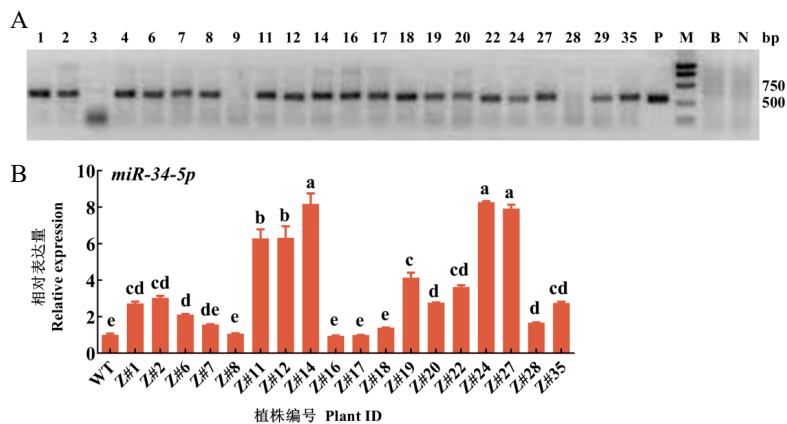


图 3 表达 *miR-34-5p* 的阳性转基因玉米植株的筛选 (A) PCR 扩增 *basta* 基因筛选阳性转基因玉米; (B) T1 代转基因玉米不同植株中 *miR-34-5p* 的相对表达量

Fig. 3 Screening of positive genetically modified (GM) maize plants expressing *miR-34-5p* (A) Selection of positive GM maize by PCR amplification of the *basta* gene; (B) Relative expression of *miR-34-5p* in different lines of T1 GM maize

注: M, DL2000 marker; B, 空白对照; N, 阴性对照; P, 阳性对照。WT, 野生型; 柱状图上不同的小写字母表示显著差异,  $P<0.05$ 。Note: M, DL2000 marker; B, Blank control; N, Negative control; P, Positive control. WT, Wild type; Different lowercase letters above the bars indicated significant differences,  $P<0.05$ .

### 2.2 草地贪夜蛾取食表达 *miR-34-5p* 的玉米后 *EcR* 的表达被抑制

为评估表达 *miR-34-5p* 的转基因玉米对草地贪夜蛾体内 *miR-34-5p* 表达量的影响, 抑制其靶标基因 *EcR* 的表达, 以野生型 (WT) 玉米为对照, 用 Z#24 转基因玉米叶片饲喂草地贪夜蛾。qPCR 分析显示 (图 4), 取食 96 h 后 *miR-34-5p* 的相对表达显著增加了 2.5 倍 ( $t=-1.945$ ,  $df=11$ ,  $P=0.032$ ), 与此同时, *SfEcR* 的表达量显著降低了

45.5% ( $t=3.033$ ,  $df=11$ ,  $P=0.011$ )。

### 2.3 表达 *miR-34-5p* 的玉米对草地贪夜蛾的毒力

通过盆栽生测试验评估了表达 *miR-34-5p* 的转基因玉米 (Z#12、Z#14、Z#24) 对草地贪夜蛾的毒力影响。结果如图 5, 与取食 WT 玉米相比, 草地贪夜蛾幼虫取食 Z#12、Z#14 和 Z#24 玉米后, 累积死亡率分别增加了 31.0%、25.0% 和 40.0% ( $F_{3,8}=41.023$ ,  $P<0.001$ )。存活幼虫表现出明显的发育缺陷, 幼虫的平均体长和体重分别显著降低

了 40.6%~45.1% ( $F_{3,8}=139.480$ ,  $P<0.001$ ) 和 69.3%~70.2% ( $F_{3,8}=53.963$ ,  $P<0.001$ )。蛹重减少了 17.5%、20.9% 和 30.6% ( $F_{3,8}=5.713$ ,  $P=0.011$ )，成虫繁殖力降低了 26.1%、31.4% 和 41.9% ( $F_{3,8}=$

10.525,  $P=0.004$ )。草地贪夜蛾取食 6 d 后，WT 玉米叶片几乎被完全取食，而表达 *miR-34-5p* 的转基因玉米叶片只受到轻微的危害，转基因玉米对草地贪夜蛾有良好的抗虫效果 (图 6)。

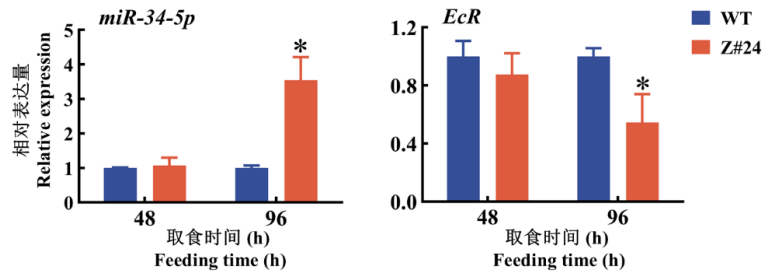


图 4 草地贪夜蛾取食转基因玉米 Z#24 和 WT 玉米后 *miR-34-5p* 和 *EcR* 的相对表达量

Fig. 4 Relative expression of *miR-34-5p* and *EcR* in *Spodoptera frugiperda* after feeding on leaves of GM maize line Z#24 and WT maize

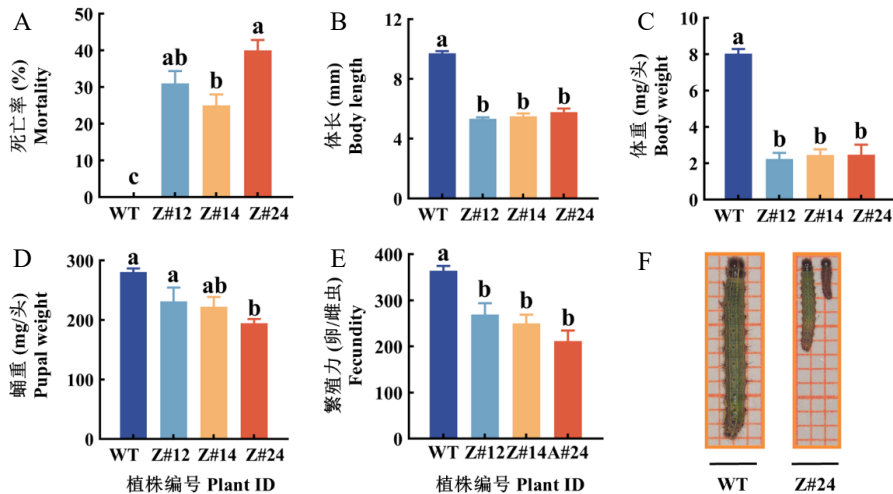


图 5 表达 *miR-34-5p* 的转基因玉米对草地贪夜蛾高毒性。草地贪夜蛾取食 T1 代转基因玉米 Z#12, Z#14 和 Z#24 和 WT 玉米后的死亡率 (A) 体长 (B) 体重 (C) 蛹重 (D) 繁殖力 (E) 和幼虫形态图 (F)

Fig. 5 Transgenic maize expressing *miR-34-5p* exhibits high toxicity against *Spodoptera frugiperda*. (A) Mortality, (B) Body length, (C) Body weight, (D) Pupal weight, (E) Fecundity and (F) Photos of *S. frugiperda* larvae after feeding on leaves of Z#12, Z#14 and Z#24 lines of T1 GM maize and WT maize

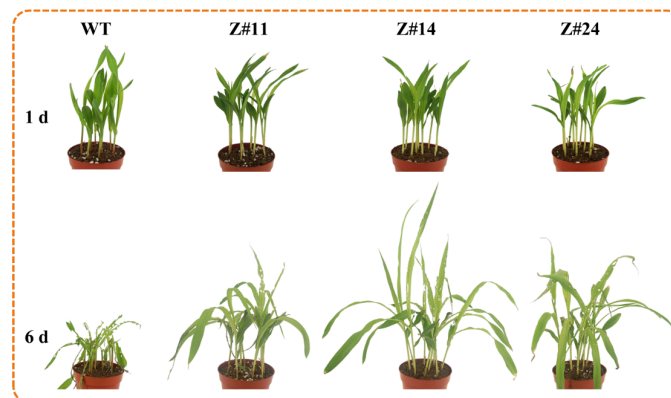


图 6 草地贪夜蛾取食转基因玉米 Z#12, Z#14, Z#24 和野生型玉米 6 d 后的为害情况

Fig. 6 Damage symptoms caused by *Spodoptera frugiperda* feeding on GM maize lines Z#12, Z#14, Z#24, and WT maize after 6 days

### 3 结论与讨论

RNAi 已经成为一种强有力的害虫防治技术 (Zotti and Smagghe, 2015; Yu *et al.*, 2016)。基于 RNAi 的害虫防治可以通过构建表达 dsRNA 的转基因植物或直接喷洒 dsRNA 制剂来实现。表达 dsRNA 的转基因植物作为害虫绿色防治策略的研究已有很多报道, 例如, 番茄潜叶蛾取食表达 *ATPase-A* 和 *Arginine kinase* dsRNA 的转基因番茄后幼虫死亡率明显增加且对番茄的危害大大减少 (Camargo *et al.*, 2016)。通过实验室和田间试验发现, 表达蚜虫 *AgDPPS1* 的棉花对蚜虫有很好的防效, 随取食时间延长, 取食 RNAi 叶片的蚜虫生存率显著降低 (Tian *et al.*, 2024)。飞蝗幼虫取食 *mAChR-C* dsRNA 转基因玉米后, *mAChR-C* 的表达受到显著抑制, 引起死亡和畸形, 证明了转基因玉米对蝗虫的高抗虫性 (Zheng *et al.*, 2025)。令人振奋的是, 近年来 dsRNA 制剂的研究与应用也有了很大的突破, 2023 年, 美国环境保护局 (EPA) 已批准通过可喷洒的 dsRNA 杀虫剂 ledoprona (与 dsPSMB5 整合) 的使用, 它是全球首个可喷洒型 dsRNA 杀虫剂, 主要是通过沉默 CPB-PSMB5 基因的表达来防治马铃薯甲虫。

miRNA 和 dsRNA 同属 RNAi 机制, 然而 miRNA 在害虫防治领域的研究仍处于起步阶段, 目前仅有少量的报道。例如, 在水稻中分别表达靶向二化螟 *EcR* 的 *miR-14* 和 *csu-novel-260*, 二化螟取食后存活率显著降低, 水稻分蘖期的死心率和抽穗期的白头率也大大降低 (He *et al.*, 2019; Zheng *et al.*, 2020)。前期的研究已经证明大肠杆菌表达的 *miR-34-5p* 对草地贪夜蛾具有很高的毒力 (Li *et al.*, 2024), 为了研究 *miR-34-5p* 是否能够通过构建转基因植物来防治害虫, 本研究成功构建了表达 *miR-34-5p* 的转基因玉米, 草地贪夜蛾取食转基因玉米后草地贪夜蛾的死亡率显著升高, 繁殖力显著降低, 对草地贪夜蛾有较好的防效, 主要原因是 *EcR* 是调控昆虫蜕皮、生长发育及繁殖的关键基因, 其表达量的精准调控直接影响昆虫的正常生命活动, 当草地贪夜蛾取食表达 *miR-34-5p* 的玉米后, *miR-34-5p* 的表达量显著上调, 导致 *EcR* 的表达量显著降低, *EcR* 的下调会直接阻断蜕皮激素信号通路的正常传导, 一方面使幼虫无法完成正常蜕皮, 出现蜕皮障碍、龄期延

长等发育迟缓表型, 进而导致死亡率升高; 另一方面, 蜕皮激素信号通路异常还会影响成虫生殖系统的发育、卵黄蛋白的合成等, 从而导致成虫产卵量减少、卵孵化率降低, 最终表现为繁殖力下降 (Song and Zhou, 2020)。草地贪夜蛾取食 6 d 后, 野生型玉米几乎被取食殆尽, 而转基因玉米虽然能健康生长, 但玉米叶片也受到部分损伤, 分析原因: 一方面, 转基因玉米中 *miR-34-5p* 的表达量还相对较低, 后续应该进一步尝试不同的转化技术, 比如: 选用玉米内源组成型强启动子 (如 Ubiquitin 启动子) 替代 CaMV 35S 启动子、或选用叶片特异性启动子实现靶标部位定向高量积累, 同时搭配增强子优化载体元件等方法提高 miRNA 在转基因作物中的表达量; 另一方面: 与化学农药相比, 表达 miRNA 的转基因玉米在害虫防治过程中见效相对较慢, 后续应用中可配合见效快的杀虫剂同时使用。该结果证明了构建 miRNA 转基因作物在害虫防治方面的可行性, 进一步拓宽了 *miR-34-5p* 在害虫绿色防治中的应用。

害虫对 RNA 生物农药产生抗性的方式可能有 2 种: (1) RNAi 中靶标基因的表达量下调或突变; (2) 靶器官 (主要是肠道) 细胞对 RNA 的吸收效率降低 (Yoon *et al.*, 2016)。与 dsRNA 相比, 基于 miRNA 的害虫防治策略在延缓害虫抗药性方面有一定的优势, 这与 miRNA 的作用机制和特征有关, 一方面, 前期研究已经证明 *miR-34-5p* 是调控昆虫生长发育、蜕皮和繁殖等关键生命过程的保守的非编码 RNA (Li *et al.*, 2022, 2024), 对害虫的生长发育至关重要, *miR-34-5p* 若发生突变, 极易导致害虫自身生理功能出现致命性缺陷。先前的研究中也提到, 害虫难以对这类维系其生命活动的核心内源性 miRNA 产生抗性选择 (Cui *et al.*, 2022); 另一方面, 一种 miRNA 通常能同时调控多个靶基因, 因此害虫必须多个基因协同突变才能产生有效抗性, 在自然条件下该概率很低, 而 dsRNA 多为单基因沉默, 容易通过单个靶标基因的突变产生抗性。然而因靶器官细胞对 RNA 吸收能力的改变而产生的抗性, dsRNA 与 miRNA 应该无太大差别。

综上, 本研究成功构建了表达昆虫内源性 *miR-34-5p* 的转基因玉米, 通过 PCR 扩增和荧光定量 PCR 筛选出了 *miR-34-5p* 高表达的玉米植株, 草地贪夜蛾取食后, *miR-34-5p* 的表达量升高, 其

靶标基因 *EcR* 的表达被显著抑制, 进而导致草地贪夜蛾的死亡率显著升高, 存活幼虫的生长发育严重受阻, 繁殖力大大降低。该研究明确了昆虫内源性 *miR-34-5p* 可通过靶向调控 *EcR* 基因实现对草地贪夜蛾生长发育与繁殖的有效抑制, 证实了昆虫内源 miRNA 介导的 RNAi 策略在转基因抗虫作物研发中的可行性与有效性, 为开发以 miRNA 为核心靶点的新型抗虫转基因作物提供了具体的基因靶点选择依据与技术研发思路; 同时, 该研究依托植物表达系统实现昆虫 miRNA 的定向递送与功能发挥, 为构建环境友好、靶标特异性强的可持续害虫防控技术体系提供了重要的理论支撑与实践参考, 也为 RNAi 技术在农业害虫绿色防控领域的应用提供了新的思路。

### 参考文献 (References)

- Baum JA, Bogaert T, Clinton W, *et al.* Control of coleopteran insect pests through RNA interference [J]. *Nat. Biotechnol.*, 2007, 25 (11): 1322–1326.
- Behura SK. Insect microRNAs: structure, function and evolution [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2007, 37 (1): 3–9.
- Camargo RA, Barbosa GO, Possignolo IP, *et al.* RNA interference as a gene silencing tool to control *Tuta absoluta* in tomato (*Solanum lycopersicum*) [J]. *PeerJ*, 2016, 4: e2673.
- Cui C, Wang Y, Li Y, *et al.* Expression of mosquito miRNAs in entomopathogenic fungus induces pathogen-mediated host RNA interference and increases fungal efficacy [J]. *Cell Reports*, 2022, 41 (4): 111527.
- Dong Y, Zhang Q, Mao Y, *et al.* Control of two insect pests by expression of a mismatch corrected double-stranded RNA in plants [J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2024, 22 (7): 2010–2019.
- Fullaondo A, Lee SY. Identification of putative miRNA involved in *Drosophila melanogaster* immune response [J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2012, 36 (2): 267–73.
- Gao J, Gong LF, Wang HH, *et al.* Expression and functional analysis of *ace1* and *ace2* reveal their differential roles in larval growth and insecticide sensitivity in *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) [J]. *Journal of Pest Science*, 2023.
- He K, Xiao H, Sun Y, *et al.* Transgenic microRNA-14 rice shows high resistance to rice stem borer [J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2019, 17 (2): 461–471.
- Li L, Shi D, Yan J, *et al.* In-vitro-expressed pxy-mir-34 shows high toxicity to multiple lepidopteran pests [J]. *Entomologia Generalis*, 2024, 44 (3): 583–590.
- Li L, Zhu B, Sun X, *et al.* miR-34-5p, a novel molecular target against lepidopteran pests [J]. *Journal of Pest Science*, 2022, 96: 209–224.
- Liang P, Gu SH, Zhang L, *et al.* Research status and prospects of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in China [J]. 2020, 63 (5): 624–638. [梁沛, 谷少华, 张雷等. 我国草地贪夜蛾的生物学、生态学和防治研究概况与展望 [J]. 2020, 63 (5): 624–638]
- Lim DH, Lee S, Han JY, *et al.* Ecdysone-responsive microRNA-252-5p controls the cell cycle by targeting *Abi* in *Drosophila* [J]. *The FASEB Journal*, 2018, 32 (8): 4519–4533.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-ΔΔC<sub>T</sub></sup> (T) Method [J]. *Methods*, 2001, 25 (4): 402–408.
- Lucas K, Raikhel AS. Insect microRNAs: biogenesis, expression profiling and biological functions [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2013, 43 (1): 24–38.
- Pinto JRL, Torres AF, Truzzi CC, *et al.* Artificial corn-based diet for rearing *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) [J]. *Journal of Insect Science*, 2019, 19 (4): 2.
- Schwab R, Ossowski S, Riester M, *et al.* Highly specific gene silencing by artificial microRNAs in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2006, 18 (5): 1121–33.
- Shang F, Niu J, Ding BY, *et al.* The miR-9b microRNA mediates dimorphism and development of wing in aphids [J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2020, 117 (15): 8404–8409.
- Song J, Li W, Zhao H, *et al.* Clustered miR-2, miR-13a, miR-13b and miR-71 coordinately target Notch gene to regulate oogenesis of the migratory locust *Locusta migratoria* [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2019, 106: 39–46.
- Song J, Zhou S. Post-transcriptional regulation of insect metamorphosis and oogenesis [J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2020, 77 (10): 1893–1909.
- Sun Y, Gong Y, He Q, *et al.* FAR knockout significantly inhibits *Chilo suppressalis* survival and transgene expression of double-stranded FAR in rice exhibits strong pest resistance [J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2022, 20 (12): 2272–2283.
- Tian W, Zhang T, Zhao JH, *et al.* HIGS-mediated crop protection against cotton aphids [J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2024, 23 (3): 692–694.
- Wang C, Guo X, Li Y, *et al.* miR-34-5p, encoded by *Spodoptera frugiperda*, participates in anti-baculovirus by regulating innate immunity in the insect host [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2022a, 222 (Pt B): 2190–2199.
- Wang H, Zhao R, Gao J, *et al.* Genetic architecture and insecticide resistance in Chinese populations of *Spodoptera frugiperda* [J]. *Journal of Pest Science*, 2022b.
- Wu Y, Weng Z, Yan H, *et al.* The microRNA-7322-5p/p38/Hsp19 axis modulates *Chilo suppressalis* cell-defences against Cry1Ca: an effective target for a stacked transgenic rice approach [J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2023, 21(9): 1827–1838.
- Xia J, Guo Z, Yang Z, *et al.* Whitefly hijacks a plant detoxification gene that neutralizes plant toxins [J]. *Cell*, 2021, 184 (7): 1693–1705 e17.
- Yogindran S, Rajam MV. Host-derived artificial miRNA-mediated

- silencing of ecdysone receptor gene provides enhanced resistance to *Helicoverpa armigera* in tomato [J]. *Genomics*, 2021, 113 (1 Pt 2): 736–747.
- Yoon JS, Shukla JN, Gong ZJ, *et al.* RNA interference in the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*: Identification of key contributors [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2016, 78: 78–88.
- Yu XD, Liu ZC, Huang SL, *et al.* RNAi-mediated plant protection against aphids [J]. *Pest Management Science*, 2016, 72 (6): 1090–1098.
- Zheng H, Hua M, Jiang M, *et al.* Transgenic expression of mAChR-C dsRNA in maize confers efficient locust control [J]. *Plant Communications*, 2025: 101316.
- Zheng X, Weng Z, Li H, *et al.* Transgenic rice overexpressing insect endogenous microRNA csu-novel-260 is resistant to striped stem borer under field conditions [J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2020, 19 (3): 421–423.
- Zhu B, Li L, Wei R, *et al.* Regulation of GSTu1-mediated insecticide resistance in *Plutella xylostella* by miRNA and lncRNA [J]. *PLoS Genetics*, 2021, 17 (10): e1009888.
- Zhu B, Sun X, Nie X, *et al.* MicroRNA-998-3p contributes to Cry1Ac-resistance by targeting ABCC2 in lepidopteran insects [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2020, 117: 103283.
- Zotti, Smaghe G. RNAi technology for insect management and protection of beneficial insects from diseases: lessons, challenges and risk assessments [J]. *Neotrop. Entomol.*, 2015, 44 (3): 197–213.