

# RNAi 技术在农作物育种中的应用及其环境安全性评价研究进展

夏蔚, 刘娜, 谢彦博, 闫伟, 董立明, 邢珍娟, 李葱葱, 龙丽坤, 李飞武\*  
(吉林省农业科学院农业质量标准与检测技术研究所, 长春 130033)

**摘要:** RNA 干扰是由双链 RNA 介导, 诱发靶基因发生转录后沉默的现象。RNAi 技术作为一种高效的基因抑制技术, 在抗病虫、品质改良、非生物胁迫耐受性等作物遗传改良领域广泛应用。在对 RNAi 作物进行生态风险评估时, 应主要关注脱靶效应、对非靶标生物的影响、dsRNA 分子的环境归趋以及其他非预期效应。本文介绍了 RNAi 技术在作物育种中的应用现状, 阐述了 RNAi 作物环境安全性评价的关键内容及程序, 并对我国 RNAi 作物研究和安全评价做了展望。

**关键词:** RNAi 技术; 转基因作物; 环境安全性评价

中图分类号: Q789

文献标识码: A

文章编号: 2096-5877(2019)06-0033-05

## The Application of RNAi Technology in Crop Breeding and Its Environmental Safety Assessment

XIA Wei, LIU Na, XIE Yanbo, YAN Wei, DONG Liming, XING Zhenjuan, LI Congcong, LONG Likun, LI Feiwu\*

(*Institute of Agricultural Quality Standard and Testing Technology, Jilin Academy of Agricultural Sciences, Changchun 130033, China*)

**Abstract:** RNA interference (RNAi) is a post-transcriptional gene silencing mechanism mediated by double stranded RNA (dsRNA). As an efficient gene suppression technology, RNAi has been widely used in crop genetic improvement, such as the resistance of disease and insects, the improvement of crop quality, and the tolerance of abiotic stresses. When assessing the ecological risk assessment of RNAi crops, we should pay more attention to off-target effects, non-target effects, environmental fate of dsRNA molecules and other unexpected effects. This review summarized the application status of RNAi technology in crop breeding, discussed the key problems and procedures of ecological risk assessment of RNAi crops, and prospected the future research and safety assessment of RNAi crops in China.

**Key words:** RNA interference; Genetically modified crops; Environmental safety assessment

RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 是由双链 RNA (Double-stranded RNA, dsRNA) 介导的转录后基因沉默现象, 通过特异性降解同源基因 mRNA, 导致内源靶基因的表达发生沉默<sup>[1]</sup>。RNAi 的基本原理涉及 2 个关键分子: 一个是核酸酶 Dicer, 其将 dsRNA 剪切为具有活性的小分子干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA), 进而诱发 RNAi; 另一个是 RNA 诱导的沉默复合体 (RNA-induced silencing complex, RISC), RISC 由 siRNA、

Argonaute (AGO) 及其他蛋白质组成, siRNA 负责识别并通过碱基互补结合靶标 mRNA, AGO 负责剪切被 RISC 捕获的靶标 mRNA, 使后者沉默<sup>[2]</sup>。

RNAi 技术自 20 世纪 90 年代被发现以来, 已作为一种高效的基因抑制 (gene knockdown) 技术被广泛应用于作物生物技术育种领域, 在抗病虫、耐非生物胁迫、品质改良等育种方面已取得显著的进展<sup>[3]</sup>, RNAi 干扰玉米、马铃薯等产品已进入商业化应用阶段。与传统转基因作物一样, 基于 RNAi 技术的转基因作物在生产应用前也有安全性的考虑, 不同的是, 前者因转入的外源目的基因表达了新的蛋白质, 因此侧重于新表达蛋白质的安全性评价, 而 RNAi 转基因产品并不产生新蛋白质, 更多的是从基因沉默的特异性来评价

收稿日期: 2019-03-11

基金项目: 转基因生物新品种培育重大专项 (2018ZX0801102B)

作者简介: 夏蔚 (1982-), 女, 助理研究员, 主要从事转基因生物安全评价与检测工作。

通讯作者: 李飞武, 男, 博士, 研究员, E-mail: lifeiwu3394@sina.com

RNAi产品的安全性,包括脱靶效应(off-target)、对非靶标生物影响等<sup>[4]</sup>。

## 1 RNAi技术在农作物育种中的应用

### 1.1 抗虫育种研究

虫害是农业生产中主要的减产因子,生物技术育种是害虫绿色防控的重要手段。转*Bt*基因作物在鳞翅目和鞘翅目害虫防控中已应用20余年,但在持续的选择压下,长期使用*Bt*基因可导致靶标害虫产生抗性,使*Bt*基因丧失杀虫效果<sup>[5]</sup>,科学家们一直在探索新的杀虫机制的生物育种技术。Fire通过给秀丽线虫注射表达靶向dsRNA的细菌,首次证实RNAi技术具有杀虫潜力<sup>[6]</sup>。随后,Baum等根据美国西部玉米根虫(WCR)的*V-ATPase A*基因设计靶标dsRNA,通过dsRNA直接饲喂WCR、转基因玉米田间接虫、转基因玉米根系饲喂WCR等多种方式,证实靶标dsRNA可通过RNA干涉途径杀死WCR<sup>[7]</sup>。Mao等根据棉铃虫细胞色素P450基因*CYP6AE14*设计特异性dsRNA,并将其导入棉花,获得了对棉铃虫具有明显抗虫效果的转基因植物<sup>[8]</sup>,进一步证实了利用RNAi技术培育抗虫作物的可行性。一些利用RNAi技术防治蚜虫、二化螟、棉铃虫等主要害虫的研究已被报道<sup>[9-11]</sup>,同时表达*Bt*杀虫蛋白Cry3Bb1和具有杀虫活性的dsRNA(*DvSnf7*)的抗WCR玉米已实现商业化种植<sup>[12]</sup>。

### 1.2 抗病育种研究

研究表明,在植物中表达病毒基因组的部分序列,几乎可100%抑制靶标病毒的侵染,这为RNAi抗病育种提供了科学依据<sup>[13]</sup>。杨向东等将大豆花叶病毒SC-3株系的P3基因RNAi片段导入栽培大豆品种,发现转基因大豆植株在田间条件下对SC-3、SC7、SC15、SC18、SMV-R等多个大豆花叶病毒株系及西瓜花叶病毒具有良好抗性,且抗性性状能稳定遗传<sup>[14]</sup>。Hameed等将3种马铃薯常见病毒(PVX、PVY和PVS)的部分衣壳蛋白基因序列融合成一段600 bp的反向重复序列,使其在CaMV35S启动子驱动下表达,获得了可同时抵抗这3种病毒病侵染的转基因马铃薯植株<sup>[15]</sup>。仲晓芳等将大豆胞囊线虫*Hg-rps-23*基因的RNA干扰片段导入大豆,获得了可显著提高对大豆胞囊线虫3号生理小种抗性的转基因大豆新材料<sup>[16]</sup>。RNAi技术还被证实可用于防治水稻条纹叶枯病、番木瓜环斑病毒病等病毒病害<sup>[17-18]</sup>,在细

菌和真菌病害的防控方面也可发挥重要作用<sup>[19]</sup>。

### 1.3 品质改良研究

应用常规育种技术开展作物品质改良耗时耗力,作为一种新型基因工程技术,RNAi能显著提升作物品质改良的效率。研究表明,通过RNAi沉默 $\beta$ -胡萝卜素羟化酶基因,可提高马铃薯中 $\beta$ -胡萝卜素和叶黄素等类胡萝卜素的含量,提升其营养价值<sup>[20]</sup>。通过阻断ACC氧化酶的表达,可显著降低番茄中乙烯形成,延长保质期,而抑制 $\alpha$ -甘露糖苷酶和 $\beta$ -乙酰己糖胺酶等与果实软化相关的物质合成,也能增加番茄的货架期<sup>[21]</sup>。此外, RNAi技术在高直链淀粉小麦、高油大豆等研究中显现出较好的效果<sup>[22-23]</sup>。

### 1.4 其他方面研究

除了抗病、抗虫和品质改良育种, RNAi在干旱、盐分、寒冷等非生物胁迫耐受性、抗寄生性杂草、改变花色、雄性不育、控制真菌毒素等领域研究均取得了一定进展,在作物生长发育、逆境胁迫响应和农产品食品安全领域具有广泛的应用前景<sup>[24]</sup>。

## 2 RNAi技术作物的环境安全性评价

### 2.1 评价原则

转基因技术能够突破物种间的生殖隔离,将人们所期望的基因或其他核酸序列从一个物种转移至另一个物种的基因组上,在实现精准育种目标的同时,也带来一些生态风险,如基因漂移、对非靶标生物和生物多样性影响等<sup>[25]</sup>。为保护生态环境安全,许多国家对转基因技术及其产品实行严格的安全评价和管理。

根据大多数科学共同体达成的国际共识,对转基因作物的安全评价应遵循以下六个原则:科学原则、比较分析原则、个案分析原则、熟悉原则、预防原则、分阶段原则<sup>[26]</sup>。对转基因作物开展环境安全评价,就是在科学的前提下,通过比较转基因作物与相对应的非转基因作物,在每个指标是否存在显著差异,进而得出转基因作物是否存在明显生态危害的结论。

RNAi技术从本质上还是一种遗传修饰技术,因此对RNAi作物的安全评价同样需要遵循上述原则。然而, RNAi技术的作用原理有别于传统转基因技术, RNAi作物中不产生新蛋白质,因此其评价内容和方法与传统转基因作物不尽相同,而且不同RNAi作物针对的靶标基因的功能也各有

特点,在评价中更需体现个案分析原则。

## 2.2 评价内容

### 2.2.1 功能效率评价

功能效率也称作目标性状的有效性,主要评价转基因操作是否达到了预期的目标,以及预期目标实现的程度。如果功能效率较低,则转基因产品算不上成功,特别是对抗病虫转基因作物,如不能高效地杀死靶标害虫或不能高抗靶标病害,产生抗性风险的可能性更大。对 RNAi 抗虫作物,可将人工合成的 dsRNA 按一定比例混入饲料中,或直接以 RNAi 植物组织喂饲靶标害虫,通过调查存活率、生长发育、生殖率等指标评价其效率<sup>[27]</sup>。以人工合成的 dsRNA 代替植物中表达的 dsRNA 开展生物测定试验,还需证明两者具有一致的核酸序列、二级结构及功能活性<sup>[28]</sup>。

### 2.2.2 脱靶效应

RNAi 技术的目标是抑制靶基因表达,而不影响其他基因正常表达。但事实上科学家们已经发现,如果 siRNA 与非靶标 mRNA 具有一定的序列一致性,就可能导致非靶标基因沉默<sup>[29]</sup>。脱靶效应可能会影响植物新陈代谢,导致出现生理和表型方面的非预期效应,如降低花粉活力<sup>[30]</sup>。因此,脱靶效应是 RNAi 作物安全评价的关键指标之一。靶外结合的对象可能是 RNAi 作物自身的基因,也可能是直接或间接接触 siRNA 的其他生物的基因,后者会引入对非靶标生物的影响风险。

通过分析非靶标生物基因组是否存在与 dsRNA 序列同源的基因,可以预测脱靶效应。Allen 将北美大斑长足瓢虫的转录组序列与一些 RNAi 抗虫作物中导入的 dsRNA 进行序列比较,发现瓢虫中存在与 dsRNA 序列高度一致的转录本,这可能带来靶外结合的风险,对非靶标生物产生不良影响<sup>[31]</sup>。然而,由于可获得的基因组数据库信息有限,这种对脱靶效应的预测方法也存在局限性,但随着越来越多的生物基因组序列被测定,对脱靶效应的研究将会更容易。

### 2.2.3 对非靶标生物的影响

RNAi 作物因靶外结合,对直接或间接接触 dsRNA 或 siRNA 的非靶标生物存在潜在风险。RNAi 作物对非靶标生物产生实质影响一般需满足以下条件:转基因作物表达 dsRNA;非靶标生物直接或间接取食 dsRNA;dsRNA 在非靶标生物体内不被降解;暴露量足以激发内源 RNAi 机制;导致非靶标生物体内特定 mRNA 降解或表达受抑制;该 mRNA 影响非靶标生物存活,进而导致种群

数量发生显著变化<sup>[32]</sup>。由此可见,靶外结合并非一定会显著降低非靶基因表达,而基因表达受抑制也不一定会导致显著的负面影响。

室内饲养试验是评价转基因作物对非靶标生物影响的常用方法,通过喂饲大于 10 倍田间最大暴露量的 dsRNA,可以放大对非靶标生物的生态风险。采用此方法,Pan 和 Vélez 等分别研究了玉米根虫 v-ATPase A dsRNA 对帝王蝶和蜜蜂的影响,发现 dsRNA 对帝王蝶和蜜蜂幼虫的存活率和发育历程,以及成虫羽化和寿命均没有显著影响<sup>[33-34]</sup>。孟山都公司研发的 MON87411 玉米,可表达抑制玉米根虫 *Snf7* 基因的 dsRNA (DvSnf7 RNA),针对该 dsRNA 开展的研究表明,其对蜜蜂、瓢虫、步甲、蚯蚓、鹌鹑等不同类型的非靶标生物均没有明显影响<sup>[35]</sup>。除了室内饲养试验,通过生物信息学手段从基因组和转录组水平分析 dsRNA 的脱靶效应,也可为非靶标生物影响评价提供依据。

### 2.2.4 环境归趋

RNAi 作物表达的 dsRNA 或产生的 siRNA 在环境中的留存时间与其生态风险具有一定的正相关性,因此在对 RNAi 作物进行评价时,有必要考察 dsRNA 或 siRNA 的环境归趋规律。裸露的 DNA 在水生或陆生环境中可以留存数月甚至数年,而关于 RNA 环境归趋的报道还较少<sup>[36]</sup>。近期有研究表明,DvSnf7 RNA 在不同土壤中的半衰期为 14 ~ 29 h,35 h 内降解率可达到 90%,处理约 2 d 后就检测不到有生物活性的 dsRNA,表明 DvSnf7 RNA 在土壤中难以留存和富集,这为确定 dsRNA 在环境中的暴露量提供了方法参考<sup>[37]</sup>。

### 2.2.5 交互抗性和抗性延缓

靶标害虫对抗虫作物的抗性风险,在抗虫转基因作物产业化进程中越来越受到重视。为延缓靶标害虫抗性产生,可将作用机理不同、不存在交互抗性的多个抗虫因子一并导入植物体内。研究表明,将 *Bt* 基因与 RNAi 技术结合获得的抗虫玉米和棉花,均能有效杀死 Bt 抗性害虫,两种抗虫因子间不存在交互抗性,为延缓靶标害虫抗性提供了一种有效的途径<sup>[11,38]</sup>。目前,还未见关于靶标害虫对于 RNAi 作物产生抗性的报道,这与 RNAi 抗虫作物的商业化应用较少有关。但随着 RNAi 产品的应用增多,也需要加强对 RNAi 抗性风险的关注。

### 2.2.6 其他生态风险

在传统转基因作物的生态风险评价中,除了

上述指标,还会结合转基因作物的生存竞争能力、基因漂移风险、对生态系统群落结构和有害生物地位演化的影响等方面,对其环境安全性做出综合评价<sup>[39]</sup>。上述评价内容同样适用于RNAi作物,如通过多世代的田间试验,评价RNAi作物在农艺性状、花粉活力、目标性状等方面的遗传稳定性。

此外,植物及病虫害体内广泛存在着可以遗传的碱基置换、缺失、插入等基因突变,这些自然变异可能对RNAi技术的应用产生不可预测的影响。例如,转基因作物的突变可能改变siRNA分子的核苷酸序列和基因沉默模式,产生脱靶效应;病虫害的突变可能使期望的基因沉默失效;非靶标生物的突变可能增加对dsRNA的敏感性,导致非靶标效应。植物病毒具有的快速进化和高突变率,使其更易产生对RNAi作物的抗性,对抗病毒RNAi作物的要求更高<sup>[6]</sup>。

### 3 展 望

RNAi作为一种高效、特异性的基因表达抑制技术,已被证实具有提高作物抵抗生物和非生物胁迫能力、改良作物品质、改变作物发育特性等能力,开辟了研发具有商业化价值的新型转基因作物品种的新途径,特别是为Bt作物害虫抗性治理提供了新的思路。然而,RNAi技术的成功与靶标基因的筛选密切相关,因此在RNAi作物研发过程中,应针对靶标基因设计更加精准、特异、高效的siRNA,既达到预期目标,又尽可能避免产生脱靶效应,使该技术更好地满足农业生产需求。

作为一种新型转基因技术的产物,RNAi作物在上市前也需进行科学系统的安全评价,在产业化后同样需要进行长期的生态风险监测,以避免其对生态环境造成负面影响。目前,对RNAi作物的环境安全评价工作开展得还比较有限,对脱靶效应的研究方法存在局限性,还需进一步研究siRNA在农田生态系统中的稳定性、持久性、半衰期等归趋规律,为RNAi作物的生态风险评估提供更精准的科学支持。

在我国,由于RNAi转基因作物的研究起步较晚,现行的转基因作物环境安全评价指南主要是针对表达外源蛋白的传统转基因作物制定的,未就RNAi作物不同于传统转基因作物的一些生态风险的评价进行相应规定。因此,现行指南无法满足RNAi作物的评价需要,应结合RNAi作物的特点予以完善。

### 参考文献:

- [ 1 ] 尚仁福,吴立刚.RNA干扰的机制及其应用[J].生命科学,2016,28(5):576-583.
- [ 2 ] Ali N, Datta S K, Datta K. RNA interference in designing transgenic crops[J]. GM Crops, 2010, 1(4): 207-213.
- [ 3 ] 伍国强,刘海龙,刘左军. RNAi技术及其在植物中的应用[J].分子植物育种,2018,16(19):6299-6307.
- [ 4 ] Casacuberta J M, Devos Y, du Jardin P, et al. Biotechnological uses of RNAi in plants: risk assessment considerations[J]. Trends in Biotechnology, 2015, 33(3): 145-147.
- [ 5 ] 陆宴辉,梁革梅. Bt作物系统害虫发生演替研究进展[J].植物保护,2016,42(1):7-11.
- [ 6 ] Fire A, Xu S Q, Montgomery M K, et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*[J]. Nature, 1998, 391: 806-811.
- [ 7 ] Baum J A, Bogaert T, Clinton W, et al. Control of coleopteran insect pests through RNA interference[J]. Nature Biotechnology, 2007, 25(11): 1322-1326.
- [ 8 ] Mao Y B, Cai W J, Wang J W, et al. Silencing a cotton bollworm P450 monooxygenase gene by plant-mediated RNAi impairs larval tolerance of gossypol[J]. Nature Biotechnology, 2007, 25(11): 1307-1313.
- [ 9 ] Mao J, Zeng F. Plant-mediated RNAi of a gap gene-enhanced tobacco tolerance against the *Myzus persicae*[J]. Transgenic Research, 2014, 23(1): 145-152.
- [ 10 ] Jiang S, Wu H, Liu H, et al. The overexpression of insect endogenous small RNAs in transgenic rice inhibits growth and delays pupation of striped stem borer (*Chilo suppressalis*)[J]. Pest Management Science, 2017, 73(7): 1453.
- [ 11 ] Ni M, Ma W, Wang X F, et al. Next-generation transgenic cotton: pyramiding RNAi and Bt counters insect resistance[J]. Plant Biotechnology Journal, 2017, 15: 1204-1213.
- [ 12 ] International service for the acquisition of agri-biotech applications. GM Approval Database[DB/OL]. (2019-01-22) [2019-03-03]. <http://www.isaaa.org/gmapprovaldatabase>.
- [ 13 ] Tenllado F, Llave C, Díaz-Ruiz J R. RNA interference as a new biotechnological tool for the control of virus diseases in plants[J]. Virus Research, 2004, 102(1): 85-96.
- [ 14 ] Yang X D, Niu L, Zhang W, et al. RNAi-mediated SMV P3 cistron silencing confers significantly enhanced resistance to multiple *Potyvirus* strains and isolates in transgenic soybean[J]. Plant Cell Reports, 2018, 37(1): 103-114.
- [ 15 ] Hameed A, Tahir M N, Asad S, et al. RNAi-mediated simultaneous resistance against three RNA viruses in potato[J]. Molecular Biotechnology, 2017, 59(2-3): 73-83.
- [ 16 ] 仲晓芳,杨向东,张金花,等. *Hg-rps-23*基因RNAi转基因大豆对大豆胞囊线虫的抗性研究[J].东北农业科学,2016,41(3):25-30.
- [ 17 ] Li L, Guo C, Wang B, et al. RNAi-mediated transgenic rice resistance to *Rice stripe virus*[J]. Journal of Integrative Agriculture, 2016, 15(11): 2539 - 2549.
- [ 18 ] Jia R Z, Zhao H, Huang J, et al. Use of RNAi technology to

- develop a PRSV-resistant transgenic papaya[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 12636.
- [19] Younis A, Siddique M I, Kim C K, et al. RNA Interference (RNAi) induced gene silencing: a promising approach of Hi-Tech plant breeding[J]. *International Journal of Biological Sciences*, 2014, 10(10): 1150–1158.
- [20] Eck J V, Conlin B, Garvin D F, et al. Enhancing beta-carotene content in potato by RNAi-mediated silencing of the beta-carotene hydroxylase gene[J]. *American Journal of Potato Research*, 2007, 84(4): 331.
- [21] Meli V S, Ghosh S, Prabha T N, et al. Enhancement of fruit shelf life by suppressing N-glycan processing enzymes[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(6): 2413–2418.
- [22] Regina A, Bird A, Topping D, et al. High-amylose wheat generated by RNA interference improves indices of large-bowel health in rats[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 2006, 103(10): 3546–3551.
- [23] 张原宇,董英山,于盛竹,等. RNA 干扰高油 *GmPEPc* 基因转入大豆研究[J]. *大豆科学*, 2017, 36(4): 514–518.
- [24] Saurabh S, Vidyarthi A S, Prasad D. RNA interference: concept to reality in crop improvement[J]. *Planta*, 2014, 239(3): 543–564.
- [25] 张永军,吴孔明,彭于发,等. 转基因植物的生态风险[J]. *生态学报*, 2001, 22(11): 1951–1959.
- [26] 武小霞,张彬彬,王志坤,等. 转基因作物的生物安全性管理及安全评价[J]. *作物杂志*, 2010(4): 1–4.
- [27] Bachman P M, Bolognesi R, Moar W J, et al. Characterization of the spectrum of insecticidal activity of a double-stranded RNA with targeted activity against Western Corn Rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera* LeConte)[J]. *Transgenic Research*, 2013, 22(6): 1207–1222.
- [28] Urquhart W, Mueller G M, Carleton S, et al. A novel method of demonstrating the molecular and functional equivalence between *in vitro* and plant-produced double-stranded RNA[J]. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 2015, 73(2): 607–612.
- [29] Small I. RNAi for revealing and engineering plant gene functions[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2007, 18: 148–153.
- [30] Xing S P, Zachgo S. Pollen lethality: a phenomenon in Arabidopsis RNA interference plants[J]. *Plant Physiology*, 2007, 145(2): 330–333.
- [31] Margaret L A. Comparison of RNAi sequences in insect-resistant plants to expressed sequences of a beneficial lady beetle: a closer look at off-target considerations[J]. *Insects*, 2017, 8: 27.
- [32] Roberts A F, Devos Y, Lemgo G NY, et al. Biosafety research for non-target organism risk assessment of RNAi-based GE plants[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2015, 6: 958.
- [33] Pan H P, Yang X W, Bidne K, et al. Dietary risk assessment of *v-ATPase* A dsRNAs on monarch butterfly larvae[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 8: 242.
- [34] Vélez A M, Jurzenski J, Matz N, et al. Developing an *in vivo* toxicity assay for RNAi risk assessment in honey bees, *Apis mellifera* L[J]. *Chemosphere*, 2016, 144: 1083–1090.
- [35] Bachman P M, Huizinga K M, Jensen P D, et al. Ecological risk assessment for DvSnf7 RNA: A plant-incorporated protectant with targeted activity against western corn rootworm[J]. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 2016, 81: 77–88.
- [36] Auer C, Frederick R. Crop improvement using small RNAs: applications and predictive ecological risk assessments[J]. *Trends in Biotechnology*, 2009, 27(11): 644–651.
- [37] Dubelman S, Fischer J, Zapata F, et al. Environmental fate of double-stranded RNA in agricultural soils[J]. *PLOS ONE*, 2014, 9(3): e93155.
- [38] Levine S L, Tan J G, Mueller G M, et al. Independent action between DvSnf7 RNA and Cry3Bb1 protein in southern corn rootworm, *Diabrotica undecimpunctata howardi* and colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*[J]. *PLOS ONE*, 2015, 10(3): e0118622.
- [39] Andow D A, Zwahlen C. Assessing environmental risks of transgenic plants[J]. *Ecology Letters*, 2006, 9: 196–214.