

RNAi 转基因作物安全评价研究进展

栾颖¹, 梁晋刚^{1,2}, 周晓莉¹, 张正光^{1*}

¹南京农业大学植物保护学院, 江苏 南京 210095; ²农业农村部科技发展中心, 北京 100176

摘要: 在秀丽隐杆线虫中首次发现双链 RNA(dsRNA)能特异性地导致基因沉默(RNAi)现象后,人们开始大量地研究 RNAi 技术,并将其应用于功能基因的研究,来提高作物的抗性和改良遗传育种等。本文详细介绍了 RNAi 的技术原理,并且对 RNAi 技术与传统转基因技术的区别进行分析,阐述了该技术具有重要的生物学意义,以及在农作物害虫防治领域的占据独特优势。基于 RNAi 技术存在的潜在脱靶效应,从改良植物、靶标生物和生态环境的 3 个方面具体分析该技术可能存在的风险,为 RNAi 技术的风险评估提供参考。由于 RNAi 技术仍存在风险,为了维护生态多样性和保障人们的人身安全,应尽快建立起符合实际需求的安全性评价方法,本文针对 RNAi 转基因作物的环境安全和食用安全 2 个方面的评估方案进行概述。RNAi 技术对减少害虫数量、提高水稻产量、降低种植成本以及减少化学农药污染、促进农业可持续发展来说具有重要意义,但该技术仍存在风险,需要进一步监管和研究,建立完善的生态评价系统,让 RNAi 技术在农业生产上发挥作用。

关键词: RNAi; 抗虫作物; 风险评估方案

Discussion on safety evaluation of RNAi transgenic crops

LUAN Ying¹, LIANG Jingang^{1,2}, ZHOU Xiaoli¹, ZHANG Zhengguang^{1*}

¹College of Plant Protection, Nanjing Agricultural University, Nanjing, Jiangsu 210095, China; ²Development Center of Science and Technology, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Beijing 100176, China

Abstract: With the discovery that double-stranded RNA (dsRNA) could result in gene silencing (RNA interference, RNAi) in *Caenorhabditis elegans*, scientists began to exploit this RNAi technology for the study of gene functions, in order to improve crop resistances and genetic breeding. In this paper, the principle of RNAi technology is introduced, and the differences between the RNAi and traditional transgenic technology are discussed. Based on the potential miss-target effect of RNAi technology, we analyzed the potential risks of RNAi technology from improving plants, target organisms and ecological environment, which provided reference for risk assessment of RNAi technology. Because there are still risks in RNAi technology, in order to maintain ecological diversity and safeguard people's personal safety, we should establish a safety evaluation method. Therefore, we summarize the evaluation schemes of environmental safety and food safety of RNAi genetically modified crops. RNAi technology may play an important role in reducing pest densities, increasing rice yield, reducing planting costs, reducing chemical pesticide pollution. However, there are still risks in this technology. Further supervision and research are needed to establish a sound ecological evaluation system so that RNAi technology can play a role in agricultural production.

Key words: RNAi; insect-resistant crops; risk assessment programs

1 RNAi 的发现及技术原理

RNAi(RNA interference)即 RNA 干扰,是由双链 RNA(dsRNA)诱导的同源 mRNA 高效特异性降解,造成转录后水平的基因沉默(post-transcriptional gene silencing, PTGS),影响靶标生物的正常生理活动或死亡的现象。Guo & Kemphues(1995)发现

正义 RNA 与反义 RNA 都能抑制线虫 *Caenorhabditis elegans* 的基因表达,这个结果与反义 RNA 技术理论不符。后来,Fire *et al.*(1998)发现 Guo 和 Kemphues 的实验中正义 RNA 抑制基因表达是由于污染了微量的 dsRNA,即为 RNAi 现象。随后,科学家又在多种真核生物中发现了由 dsRNA 介导的 RNAi 现象。

收稿日期(Received): 2018-10-12 接受日期(Accepted): 2018-11-26

基金项目: 转基因生物新品种培育科技重大专项(2016ZX08011-003)

作者简介: 栾颖,女,硕士研究生。研究方向: 转基因生物安全评价与检测。E-mail: luanying0327@163.com

* 通信作者(Author for correspondence), E-mail: zhgzhang@njau.edu.cn

RNAi 起始阶段会产生 RNAi 的标志性组分——小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 和另一种调控基因表达的非编码小 RNA microRNA (miRNA)。基本的 RNAi 过程可以分为 3 个主要步骤 (Tomari & Zamore, 2005)。首先, Dicer (一种 RNase III 核酶) 将在细胞中表达或引入细胞的内源或外源 dsRNA 分子, 加工成小 RNA 双链体。根据生物体的不同, 可能有一个或多个 Dicer 酶, 每个酶负责不同类型的 dsRNA 产物 (Meister & Tuschl, 2004)。例如, 在黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* Meigen 中, Dicer-1 主要用于产生 miRNA, 而 Dicer-2 则负责将长 dsRNAs 加工成 siRNA (Lee *et al.*, 2004)。其次, 这些双链体被解链, 其中一条被称为引导链的单链 RNA (ssRNA) 被优先加载到 RNA 诱导沉默复合物 (RNA-induced silencing complex, RISC) 的蛋白质复合物中。再次, RISC 复合体识别与 dsRNA 完全或部分序列同源的潜在靶信使 RNA (mRNA), 引导链促使 RISC 的内切核酸酶将 mRNA 裂解, 最终导致目的基因沉默。

RNAi 作为一种新的基因阻断技术, 具有高度特异性、高效性、持久性和信号的可传导性等特点 (李丽文等, 2007), 能够简单并高效地抑制特定基因的表达。目前主要应用于以下几个方面: (1) 基因敲除, 传统的基因敲除是反向遗传学的研究手段, 技术难度高、周期长、操作困难, 而 RNAi 技术可利用 siRNA 或 siRNA 表达载体快速、简便地抑制目的基因的表达, 并能使在体外培养的细胞中达到基因敲除的效果; (2) 基因功能分析, RNAi 技术克服了传统转基因技术苛刻繁琐的缺点, 不仅可以用于结构基因的功能研究, 还可用于细胞周期调控、代谢、信号转导、膜转运以及 DNA 损伤反应、转录或甲基化等多方面的基因功能研究; (3) 基因治疗, 用于抑制癌细胞的基因表达; (4) 调控信号转导通路, RNAi 已经被证实能诱导植物干细胞的分化; (5) 病毒感染治疗。RNAi 技术可以干扰病毒的复制及相应蛋白质的翻译, 有效地控制病毒的繁殖和传播 (周红建等, 2010)。

2 RNAi 技术与传统转基因技术的区别

传统的转基因技术是利用分子生物学和基因工程技术将外源基因插入、整合到受体植物的基因组中, 并使其在后代植株中得以遗传和表达, 从而使受体植物获得新的性状。无论过程还是最终产

品, 都涉及外源重组 DNA 的导入及整合, 且外源 DNA 在亲本作物中的插入位点是随机的。由于大部分产品转入的都是外源基因, 需要进行蛋白表达, 因此, 插入位点的不同会对外源蛋白表达效率以及受体作物本身的蛋白表达产生潜在影响。对于 RNAi 转基因作物来说, 插入位点的不同并不会导致 RNA 转录的差异, 且该过程不涉及外源蛋白的表达 (焦悦等, 2018)。传统的转基因抗虫作物是靠 Bt 蛋白来控制靶标害虫。Bt 蛋白是革兰氏阳性土壤细菌苏云金杆菌产生的一种具有高度特异性的杀虫蛋白, 这种蛋白被靶标昆虫取食后在中肠溶解为前毒素, 再被蛋白酶水解为毒素分子, 毒素分子与中肠细胞结合使细胞膜穿孔, 最终导致昆虫死亡 (林珠凤等, 2015)。Bt 蛋白生物制剂迄今仍是世界上生产与应用规模最大的微生物杀虫剂。与其他生物杀虫剂一样, Bt 生物制剂也有药效慢、持效期短、易受环境影响、成本高等缺陷与不足, 这是制约其大面积推广应用的主要因素 (陆宴辉和梁革梅, 2016)。

研究表明, RNAi 技术相比传统转基因技术有很大的优势, 主要包括: (1) 高度特异性, dsRNA 介导的 RNAi 只能特异性地降解同源 mRNA, 并不影响其他 mRNA 的表达, 因此, RNAi 技术应用于抗虫作物上时只会针对特定的一种或几种靶标生物, 而传统转基因技术突变的随机性很大; (2) 高效性, 尤其是对一些鞘翅目昆虫 (Zotti *et al.*, 2018), 少量的 dsRNA 就可以抑制大量同源 mRNA 的表达, 比传统的转基因技术节约了大量人力并缩短了时间; (3) RNAi 转基因植物表达的不是蛋白而是 dsRNA 和 siRNA, 这种表达形式易于在农作物中推广, 因为插入到植物基因组上的外源基因干扰序列部分的 mRNA 转录后形成发夹结构, 并被植物体内的 Dicer 识别降解, 不会再被翻译成蛋白质, 从而避免了外源蛋白质在植株体内的积累, 具有较高的生物安全性。作为调节植物生长发育和保持遗传稳定性的重要机制, 植物存在大量的内源 dsRNA 和 siRNA, 因此, 表达与植物自身无同源序列的 dsRNA, 不会对寄主植物产生不良的影响, 也更易被寄主植物接受 (郭强等, 2012)。综上所述, RNAi 技术具有重要的生物学意义, 在农作物害虫防治领域有广阔的前景。

近几年来, 人们将 RNAi 技术大量地应用到了

农业领域。在作物改良方面,高梦焜等(2016)通过构建 RNAi 膜蛋白载体并导入到转基因拟南芥 *Arabidopsis thaliana* Heynh 中,从而提高了拟南芥的抗寒性,Wang *et al.* (2017) 通过 RNAi 筛选出与刚毛怪柳 *Tamarix hispid* Willd 的耐盐性相关的基因;在害虫防治方面,李娇(2016)通过注射 dsRNA 沉默几丁质合成酶 A 基因从而来控制稻纵卷叶螟 *Cnaphalocrocis medinalis* Guenee, Yang *et al.* (2017)

利用 RNAi 技术敲除褐飞虱 *Nilaparvata lugens* Stal 体内的基因 *TPS1* 和 *TPS2*,导致 30%的昆虫死亡;在病害防治方面,黄静等(2017)通过 RNAi 提高了番木瓜对环斑病毒的抗性;在昆虫抗药性方面,Guo *et al.* (2015)利用 RNAi 技术沉默了小菜蛾 *Plutella xylostella* L.的转运蛋白基因,降低了其对 CryIAc 毒素的敏感性,从而影响小菜蛾的抗药性。目前已通过 RNAi 技术有效防控的主要昆虫见表 1。

表 1 目前已通过 RNAi 技术有效防控的主要昆虫

Table 1 Major insect pests that have been effectively controlled by RNA interference technology

昆虫 Insects	靶标基因 Targeted gene product	分析/方法 Assay/method	结果 Effect/comments	参考文献 References
玉米根萤叶甲 <i>Diabrotica virgifera</i>	V-ATP 酶亚基 A 和亚基 E VATPase A/E	寄主诱导的基因沉默 HIGS	死亡; 概念验证 Mortality/proof of concept	Cámargo <i>et al.</i> , 2018
柑橘木虱 <i>Diaphorina citri</i>	精氨酸激酶 Arginine kinase	水 Water	死亡 Mortality	Andrade & Hunter, 2017
黑腹果蝇 <i>Drosophila melanogaster</i>	V-ATP 酶亚基 A VATPase A	人工饲料 Artificial diet	死亡 Mortality	Whyard <i>et al.</i> , 2009
赤拟谷盗 <i>Tribolium castaneum</i>	多靶标基因 Multiple genes	注射 Injection	概念验证 Proof of concept	Knorr <i>et al.</i> , 2018
豌豆长管蚜 <i>Acyrtosiphon pisum</i>	V-ATP 酶亚基 E VATPase E	人工饲料 Artificial diet	死亡 Mortality	Whyard <i>et al.</i> , 2009
烟草天蛾 <i>Manduca sexta</i>	基因 <i>CYP6B46</i> Gene <i>CYP6B46</i>	病毒诱导的基因沉默 VIGS	死亡 Mortality	Pavan <i>et al.</i> , 2012
马铃薯甲虫 <i>Leptinotarsa decemlineata</i>	多靶标基因 Multiple genes	叶组织 Leaf tissue	死亡 Mortality	Zhu <i>et al.</i> , 2011
埃及伊蚊 <i>Aedes aegypti</i>	ATP 依赖的外派泵 ATP-dependent efflux pump	水 Water	死亡 Mortality	Figueiransur <i>et al.</i> , 2013
烟粉虱 <i>Bemisia tabaci</i>	V-ATP 酶亚基 A 和核糖体蛋白 L9 VATPase A and rpL19	人工饲料 Artificial diet	死亡 Mortality	Upadhyay <i>et al.</i> , 2011
蔬菜桃蚜 <i>Myzus persicae</i>	裂隙基因 Gap gene hunchback	寄主诱导的基因沉默 HIGS	死亡 Mortality	Mao & Zeng, 2013
褐飞虱 <i>Nilaparvata lugens</i>	几丁质合成酶基因 A Chitin synthase gene A	人工饲料 Artificial diet	死亡 Mortality	Li <i>et al.</i> , 2017
长红锥蝽 <i>Rhodnius prolixus</i>	基因 <i>NP2</i> Gene <i>Nitroporin 2</i>	人工饲料 Artificial diet	死亡 Mortality	Paim <i>et al.</i> , 2013
飞蝗 <i>Locusta migratoria</i>	多靶标基因 Multiple genes	人工饲料 Artificial diet	没有致命的靶基因 No lethal gene targeted	He <i>et al.</i> , 2010; Hu & Xia, 2016
沙漠蝗 <i>Schistocerca gregaria</i>	微管蛋白和甘油醛-3-磷酸脱氢酶 Tubulin/GAPDH	人工饲料 Artificial diet	没有致命的靶基因 No lethal gene targeted	Wynant <i>et al.</i> , 2012
红火蚁 <i>Solenopsis invicta</i>	信息素合成激活肽 PBAN	人工饲料 Artificial diet	死亡 Mortality	Choi <i>et al.</i> , 2012
棉铃虫 <i>Helicoverpa armigera</i>	基因 <i>EcR</i> Gene <i>EcR</i>	寄主诱导的基因沉默 HIGS	死亡 Mortality	Yogindran & Rajam, 2016
甜菜夜蛾 <i>Spodoptera exigua</i>	几丁质合成酶基因 A 和基因 <i>EcR</i> Chitin synthase A/ <i>EcR</i>	人工饲料 Artificial diet	死亡 Mortality	Chen <i>et al.</i> , 2008
德国小蠊 <i>Blattella germanica</i>	α 微管蛋白 α -tubulin	人工饲料 Artificial diet	死亡 Mortality	Lin <i>et al.</i> , 2016

3 RNAi 技术可能存在的风险

近年来,虽然 RNAi 已经成为作物保护的有效和成功的技术,但在全面采用该技术控制有害生物

之前还有一些问题要解决。使用基于 RNAi 的线虫处理策略的一个主要问题是潜在的脱靶效应,即 siRNA 与非靶标基因 RNA 发生互补配对并非特异

性地抑制了该基因的表达(尚仁福和吴立刚, 2016)。由于 RNAi 机制以高度序列特异性的方式发生,与导入的 dsRNA 分子具有部分同源性的内源转录物的交叉杂交可能导致非靶基因的沉默,这可能对非靶向生物体产生影响,具有潜在的风险(Dutta *et al.*, 2014)。

3.1 对改良植物本身的风险

3.1.1 dsRNA 与作物的转基因蛋白相互作用 转基因抗虫作物 Bt 蛋白的作用模式是结合昆虫的中肠受体细胞,随后将细胞穿孔导致细胞裂解(Vachon *et al.*, 2012),而 dsRNA 的作用模式是消耗靶 mRNA(Kennerdell & Carthew, 1998),这 2 种作用模式是不相关的,但 Bt 蛋白很有可能与 dsRNA 结合并在转基因作物中表达。因此,针对 Bt 蛋白与 dsRNA 潜在的结合要进行风险评估。Bachman *et al.* (2016)评估了 Cry 蛋白和 dsRNA(Cry3Bb1 和玉米根虫 *Diabrotica virgifera* LeConte 的 DvSnf7 dsRNA)之间的潜在相互作用,抗虫玉米杂交种 MON 87411 既可以产生抵抗玉米根虫的 Cry3Bb1 Bt 蛋白,又可以针对玉米根虫产生 DvSnf7 dsRNA,使玉米根虫发生 RNA 干扰。李翠萍等(2012)、Belden & Lydy (2006)采用了 2 种方法对这两者的潜在相互作用进行了评估,第一种方法是单独评估 Cry 蛋白和 dsRNA 在玉米根虫内的反应水平,再将两者结合评估,结果证明两者组合的反应水平是单独反应水平累加的结果,并且与独立反应下的预测反应水平没有显著差异。第二种方法采用固定的半致死浓度测定法,即将一方的固定亚致死浓度加入到另一方的有效浓度中,测定 12 d 内两者的半数致死浓度(LC₅₀)是否有变化,结果发现 Cry3Bb1 和 DvSnf7 的 LC₅₀均不受对方影响。另外,Levine *et al.* (2015)用对 Cry3Bb1 敏感、对 DvSnf7 不敏感的科罗拉多马铃薯甲虫 *Leptinotarsa decemlineata* (Say)测试了 Cry3Bb1 和 DvSnf7 之间相互作用的潜力,结果证明 DvSnf7 不改变 Cry3Bb1 的活性。

3.1.2 转基因作物遗传稳定性 转基因作物在不同代际间目的基因的整合和表达能力不尽相同,后代可能发生可遗传基因突变(即碱基替换、删除、插入),且编码 siRNA 基因比编码蛋白基因的变异率高(Obbard *et al.*, 2009)。因此,应分析害虫的抗性发展,评估其发生时间、影响规模(局部的、区域的或全国性的)及严重程度,并建立预测模型。此外,

只有建立统一的 sRNA 活性标准才能开展可比性评价,检测至少 3 代目的基因表达的稳定性和观察目标性状表现的稳定性(贺炜华等,2008)。

3.2 对靶标生物的风险

转基因作物被靶标害虫长期食用后,靶标害虫种群易发生抗性进化,通过对杀虫物质的整合或降解,使作用方式中的任何一个步骤无效或目标部位的敏感性降低,可在靶标生物种群中产生抗性导致作物抗虫的持久性降低。尽管还没有鉴定出 RNAi 的抗性机制,但可以假定潜在的抗性机制。如在反应链中只要存在以下任何一种情况:靶标害虫摄取的 dsRNA 减少、消化系统中分子降解导致细胞吸收的 dsRNA 减少、Dicer 酶处理得到的小 RNA 减少、siRNA 分子的 RISC 复合物识别减少、RISC 复合物不能降解目标 mRNA 或阻断 RNAi 的系统扩散等, RNAi 转基因作物对靶标生物的抗性就会降低(Fishilevich *et al.*, 2016)。昆虫还可通过增加目标基因序列的转录速度或上调其他与目标(沉默)基因有相同或相似功能的基因来避免基因沉默。

庇护所策略是目前害虫抗性治理的主要方法(Fitt *et al.*, 1994)。庇护所内种植的是不包含杀虫物质并允许对杀虫物质敏感的昆虫存活的作物,对特定性状没有选择压力,因此,可以保存不具有抗性等位基因的昆虫。将庇护所和转基因作物混合种植,使敏感个体与转基因植株上的抗性个体随机交配,从而使它们的后代抗性等位基因是杂合的。如果杂合子产生的后代在转基因抗虫植株上也不能存活,即达到了治理害虫的目的(Gould, 1998)。

3.3 对生态环境的风险

3.3.1 dsRNA 在环境中残留 RNAi 生态风险评估的一个重要组成部分是确定杀虫物质残留在环境中的潜在可能性以及潜在的非目标物种的种群数量。通过检测活性杀虫分子的环境稳定性,可以确定对易感染的非靶标生物是否存在长期风险(Kough & Edelstein, 2012)。Dubelman *et al.* (2014)针对不同理化性质的土壤进行了检测,并将非靶标生物暴露于 dsRNA 培养土壤以评估生物活性(即昆虫死亡率)。结果表明,在粉砂壤土、壤砂土和黏壤土这 3 种土壤类型中,玉米根虫 Snf7 dsRNA 在 48 h 后是不可检测的, Snf7 dsRNA 的半衰期小于 30 h。很多报道也证实 Bt 蛋白半衰期在一到几天范围内(Bryan, 2005), Snf7 dsRNA 和其他 dsRNA

不可能在土壤中持续存在。如果要证明 dsRNA 在土壤中的持久性,有必要了解被暴露的黏附生物体是否对 dsRNA 敏感,同时是否具备必要的加工 RNA 的分子和与之配对的靶序列。

3.3.2 对非靶标生物的影响 靶标生物摄入的 dsRNA 对其有高度的特异性 (Baum *et al.*, 2007), 然而多个研究表明,序列特异性反应会随着物种之间进化距离和序列间分歧的增加而降低 (Whyard *et al.*, 2009)。目前,用于转基因抗虫作物的生态风险评估为评估 RNAi 介导的昆虫保护作物的潜在危害提供了基础。如针对 DvSnf7 的 dsRNA 的致死和亚致死能力在 4 个目和 10 个科的昆虫中进行的评估,结果表明, DvSnf7 的 dsRNA 杀虫活性范围很窄,只有在甲虫亚科的甲虫评估中观察到这种影响,在敏感物种中须满足一定的序列要求才能与 DvSnf7 匹配,且在昆虫中实现 RNAi 介导的反应存在额外的障碍,因此不是所有的物种都对摄入的 dsRNA 敏感,或在环境暴露的低浓度下不敏感 (Allen & Rd, 2012; Bachman *et al.*, 2013; Huvenne & Smagghe, 2010; Terenius *et al.*, 2011)。因此,评估 dsRNA 对非靶标生物的影响,可以同时喂食靶标和非靶标生物,重点监测与靶标生物序列同源性高而易受感染的生物,并测试 RNAi 中使用的每种 dsRNA 对非靶标生物的影响。

4 RNAi 技术的安全评价

目前的科技水平不能预测 RNAi 转基因作物对环境和被人们食用后造成的影响,因此,必须采取一系列严格的措施对转基因作物进行全程安全性评价和监控管理,维护生态多样性,保障人们的人身安全。虽然国际上已有一些经验和数据可以借鉴,但仍需对 RNAi 这项新技术作出具体分析,以便尽快建立起符合实际需求的安全性评价方法,这样才能优化当前的转基因技术,将 RNAi 转基因作物进行商业化种植。

4.1 环境安全评价

RNAi 转基因作物在环境释放期间可能会对周边生态造成影响,危害当地的生态多样性。为了贯彻环境可持续发展的理念,要对转基因作物进行严格的环境安全评价。主要包括:(1)土壤微生物安全评价, RNAi 转基因作物在大田种植时,作物本身及其基因产物进入土壤后可能与土壤微生物相互作用,影响土壤中微生物的活动,从而影响土壤肥

力;(2)生存竞争力安全评价, RNAi 转基因作物中外源基因表达可能具有更强的环境适应能力,将其释放到生态环境中后,与非转基因的作物竞争过程中具有更强的竞争力,可能影响到生物的多样性,甚至变成新型的杂草 (刘华清等, 2010); (3)基因漂移安全评价, RNAi 转基因作物的新基因可能会在生态中发生基因漂移和与近缘野生种杂交,要针对这 2 种情况对当地植物的生长情况进行检测;(4)对非靶标生物的安全评价, RNAi 转基因作物可能会对非靶标生物的生存造成影响,因此要监测作物周围的非靶标生物的活性及评价其潜在的影响;(5)靶标生物抗性安全评价,靶标生物可能会不断进化,淘汰对作物敏感的个体,最终对作物产生抗性,因此要监测评估靶标生物不同代的抗性。

4.2 食用安全评价

RNAi 转基因作物的食用安全与人类生命安全息息相关,也是人们最关注的问题。因此, RNAi 转基因作物从实验室转向大规模生产之前要实施一系列的食用安全评价。(1)营养学安全评价。检测 RNAi 转基因作物中的蛋白质、淀粉、纤维、矿物质以及其他与人类健康有关的营养物质,还有凝集素、植酸酶、蛋白酶等抗营养因素与生物碱、毒草等天然毒素,评估这些物质的含量与非转基因品种之间是否有显著性差异。(2)毒理学安全评价。应考虑 RNAi 转基因作物是否会带来新的毒素或存在产生新毒素的情况。(3)致敏性学安全评价。判断新基因的来源,根据基因是否来源于已知的对人体致敏的物种而采取不同的分析步骤。比较氨基酸序列的相似度,再进行特异性血清筛选实验,然后进行模拟胃肠液消化实验。建立动物模型实验,根据各阶段的测试结果,对 RNAi 转基因作物致敏性进行评价。(4)非期望效应安全评价。RNAi 转基因作物可能会出现与预期效果不符的现象,包括 RNAi 转基因作物自身可能出现的非期望效应,以及食用了转基因食物后,动物在生理上可能存在的非期望变化。目前 RNAi 转基因作物非预期效应的测定方法包括靶方法和非靶方法 2 种。(5)肠道健康安全评价。RNAi 转基因食物可能会影响肠道微生物菌群从而影响人体健康,目前主要采用亚型分析法非定向检测肠道微生物,包括微阵列分析基因表达、蛋白双向电泳和质谱、分析蛋白质、液谱结合核磁共振分析化合物等 (李媛媛, 2017)。

5 RNAi 技术的前景与展望

本文在前人研究 RNAi 技术的基础上进行了一定的补充和完善,介绍了现阶段的主要潜在风险以及可行的评估方案, RNAi 技术具有广阔的农业应用前景,不但可以有效减少害虫数量、提高水稻产量、降低种植成本,还可以减少化学农药造成的环境污染,有利于实现农业的可持续发展。同时, RNAi 技术也存在一定的生态风险,虽然 RNAi 技术影响生态安全性的研究已取得了一些进展,但仍存在许多未知领域有待澄清和证明。针对目前 RNAi 的研究现状,应对其转基因作物大规模商品化种植后可能出现的生态风险进行长期的系统监测,同时加强对作物生物安全的试验技能研究,发展快速、准确检测 RNAi 作物生态风险的新技术和新方法,建立完善的生态安全评价体系,从而充分发挥 RNAi 技术在农业生产上的作用。

参考文献

高梦烛,赵亚林,闫青地,张海丽,王凤茹,董金皋,2016. 拟南芥 *PMRP* 基因在叶绿体淀粉粒积累和抗寒性中的作用. *中国农业科学*, 49(5): 832-839.

郭强,范仲学,褚栋,李晓晴,2012. RNA 干扰技术在农作物害虫防治中的应用. *山东农业科学*, 44(12): 16-18.

贺伟华,曾富华,陈信波,2008. 转基因植物遗传传递稳定性. *湛江师范学院学报*, 29(6): 57-61.

黄静,贾瑞宗,孔华,郭静远,王绪朋,郭安平,2017. 基于 RNAi 抗 PRSV 番木瓜株系的培育及其分子特征验证. *热带作物学报*, 38(3): 513-520.

焦悦,付伟,翟勇,2018. RNAi 技术在作物中的应用及安全评价研究. *作物杂志* (1): 9-15.

李翠萍,吴民耀,王宏元,2012. 3 种半数致死浓度计算方法之比较. *动物医学进展*, 33(9): 89-92.

李娇,2016. 利用 RNA 干扰技术沉默稻纵卷叶螟几丁质合成酶 A 基因. 硕士学位论文. 贵阳: 贵州大学.

李丽文,朱延明,李杰,柏锡,才华,2007. RNAi 技术在植物功能基因组学中的研究进展. *东北农业大学学报*, 38(1): 119-124.

李媛媛,2017. 探究农业转基因作物及其食用安全评价对策研究进展. *农业与技术*, 37(18): 247.

林珠凤,陈海燕,吉训聪,2015. 害虫对转 *Bt* 基因作物的抗性及其治理. *热带生物学报*, 6(4): 497-503.

刘华清,李胜清,陈浩,2010. 转基因作物安全评价及检测技术. *华中农业大学学报(社会科学版)* (6): 14-19.

陆宴辉,梁革梅,2016. Bt 作物系统害虫发生演替研究进展. *植物保护*, 42(1): 7-11.

尚仁福,吴立刚,2016. RNA 干扰的机制及其应用. *生命科学*, 28(5): 576-583.

周红建,黄松,王雄伟,2010. RNAi 技术研究新进展. *生物技术通报* (12): 84-87.

ALLEN M L, RD W W, 2012. Saliva of *Lygus lineolaris* digests double stranded ribonucleic acids. *Journal of Insect Physiology*, 58: 391-396.

ANDRADE E C, HUNTER W B, 2017. RNAi feeding bioassay: development of a non-transgenic approach to control Asian citrus psyllid and other hemipterans. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 162(3): 389-396.

BACHMAN P M, BOLOGNESI R, MOAR W J, MUELLER G M, PARADISE M S, RAMASESHADRI P, TAN J, UFFMANJ P, WARREN J A, WIGGINS B E, 2013. Characterization of the spectrum of insecticidal activity of a double-stranded RNA with targeted activity against western corn rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera* LeConte). *Transgenic Research*, 22: 1207-1222.

BACHMAN P M, HUIZINGA K M, JENSEN P D, MUELLER G, TAN J, UFFMAN J P, LEVINE S L, 2016. Ecological risk assessment for DvSnf7 RNA: a plant-incorporated protectant with targeted activity against western corn rootworm. *Regulatory Toxicology and Pharmacology: RTP*, 81: 77-88.

BAUM J A, BOGAERT T, CLINTON W, HECK G R, FELDMANN P, ILAGAN O, JOHNSON S, PLAETINCK G, MURNYIKWA T, PLEAU M, 2007. Control of coleopteran insect pests through RNA interference. *Nature Biotechnology*, 25: 1322-1326.

BELDEN J B, LYDY M J, 2006. Joint toxicity of chlorpyrifos and esfenvalerate to fathead minnows and midge larvae. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25: 623-629.

BRYAN W C, 2005. Environmental fate and effects of *Bacillus thuringiensis* (Bt) proteins from transgenic crops: a review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 4643-4695.

CAMARGO C, WU K, FISHLEVICH E, NARVA K E, SIEGFRIED B D, 2018. Knockdown of RNA interference pathway genes in western corn rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera*, identifies no fitness costs associated with Argonaute 2 or Dicer-2. *Pesticide Biochemistry & Physiology*, 148: 103-110.

CHEN X, TIAN H, ZOU L, TANG B, HU J, ZHANG W, 2008. Disruption of *Spodoptera exigua* larval development by silencing chitin synthase gene A with RNA interference. *Bulletin of Entomological Research*, 98: 613-619.

CHOI M Y, VANDER MEER R K, COY M, SCHARF M E,

2012. Phenotypic impacts of PBAN RNA interference in an ant, *Solenopsis invicta*, and a moth, *Helicoverpa zea*. *Journal of Insect Physiology*, 58: 1159–1165.
- DUBELMAN S, FISCHER J, ZAPATA F, HUIZINGA K, JIANG C, UFFMAN J, LEVINE S, CARSON D, 2014. Environmental fate of double-stranded RNA in agricultural soils. *PLoS ONE*, 9: e93155.
- DUTTA T K, BANAKAR P, RAO U, 2014. The status of RNAi-based transgenic research in plant nematology. *Frontiers in Microbiology*, 5: 760.
- FIGUEIRAMANSUR J, FERREIRAPEREIRA A, MANSUR J F, FRANCO T A, ALVARENGA E S, SORGINE M H, NEVES B C, MELO A C, LEAL W S, MASUDA H, 2013. Silencing of P-glycoprotein increases mortality in temephos-treated *Aedes aegypti* larvae. *Insect Molecular Biology*, 22: 648–658.
- FIRE A, XU S, MONTGOMERY M K, KOSTAS S A, DRIVER S E, MELLO C C, 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391: 806–811.
- FISHILEVICH E, VELEZ A M, STORER N P, LI H, BOWLING A J, RANGASAMY M, WORDEN S E, NARVA K E, SIEGFRIED B D, 2016. RNAi as a management tool for the western corn rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera*. *Pest Management Science*, 72: 1652–1663.
- FITT G P, MARES C L, LLEWELLYN D J, 1994. Field evaluation and potential ecological impact of transgenic cottons (*Gossypium hirsutum*) in Australia. *Biocontrol Science and Technology*, 4: 535–548.
- GOULD F, 1998. Sustainability of transgenic insecticidal cultivars: integrating pest genetics and ecology. *Annual Review of Entomology*, 43: 701–726.
- GUO Z, KANG S, ZHU X, XIA J, WU Q, WANG S, XIE W, ZHANG Y, 2015. The novel ABC transporter ABC1 is a potential target for RNAi-based insect pest control and resistance management. *Scientific Reports*, 5: 13728.
- GUO S, KEMPHUES K J, 1995. Par-1, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. *Cell*, 81: 611–620.
- HE Z B, CAO Y Q, YIN Y P, WANG Z K, CHEN B, PENG G X, XIA Y X, 2010. Role of hunchback in segment patterning of *Locusta migratoria manilensis* revealed by parental RNAi. *Development Growth & Differentiation*, 48: 439–445.
- HU J, XIA Y, 2016. F1-ATP synthase α -subunit: a potential target for RNAi-mediated pest management of *Locusta migratoria manilensis*. *Pest Management Science*, 72: 1433–1439.
- HUVENNE H, SMAGGHE G, 2010. Mechanisms of dsRNA uptake in insects and potential of RNAi for pest control: a review. *Journal of Insect Physiology*, 56: 227–235.
- KENNERDELL J R, CARTHEW R W, 1998. Use of dsRNA-mediated genetic interference to demonstrate that frizzled and frizzled 2 act in the wingless pathway. *Cell*, 95: 1017–1026.
- KNORR E, FISHILEVICH E, TENBUSCH L, FREY M L F, RANGASAMY M, BILLION A, WORDEN S E, GANDRA P, ARORA K, LO W, 2018. Gene silencing in *Tribolium castaneum* as a tool for the targeted identification of candidate RNAi targets in crop pests. *Scientific Reports*, 8: 206.
- KOUGH J L, EDELSTEIN R, 2012. EPA regulatory requirements for plant-incorporated protectants // CHRIS W, MCHUGHEN A. *Regulation of agricultural biotechnology: the United States and Canada*: 163–174.
- LEE Y, KIM M, HAN J, YEOM K H, LEE S, BAEK S H, KIM V N, 2004. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *The EMBO Journal*, 23: 4051–4060.
- LEVINE S L, TAN J, MUELLER G M, BACHMAN P M, JENSEN P D, UFFMAN J P, 2015. Independent action between DvSnf7 RNA and Cry3Bb1 protein in southern corn rootworm, *Diabrotica undecimpunctata howardi* and Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*. *PLoS ONE*, 10: e0118622.
- LI T, CHEN J, FAN X, CHEN W, ZHANG W, 2017. MicroRNA and dsRNA targeting chitin synthase a reveal a great potential for pest management of the hemipteran insect *Nilaparvata lugens*. *Pest Management Science*, 73: 1529–1537.
- LIN Y H, HUANG J H, LIU Y, BELLES X, LEE H J, 2016. Oral delivery of dsRNA lipoplexes to German cockroach protects dsRNA from degradation and induces RNAi response. *Pest Management Science*, 73: 960–966.
- MAO J, ZENG F, 2013. Plant-mediated RNAi of a gap gene-enhanced tobacco tolerance against the *Myzus persicae*. *Transgenic Research*, 23: 145–152.
- MEISTER G, TUSCHL T, 2004. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature*, 431: 343–349.
- ORBARD D J, GORDON K H J, BUCK A H, JIGGINS F M, 2009. The evolution of RNAi as a defence against viruses and transposable elements. *Philosophical Transactions Biological Sciences*, 364: 99–115.
- PAIM R M, ARAUJO R N, LEHANE M J, GONTIJO N F, PEREIRA M H, 2013. Long-term effects and parental RNAi in the blood feeder *Rhodnius prolixus* (Hemiptera; Reduviidae). *Insect Biochemistry & Molecular Biology*, 43: 1015–1020.

- PAVAN K, SUBHASH P S, BALDWIN I T, 2012. Tobacco rattle virus vector: a rapid and transient means of silencing *manduca sexta* genes by plant mediated RNA interference. *PLoS ONE*, 7: e31347.
- TERENIUS O, PAPANICOLAOU A, GARBUTT J S, ELEFThERIANOS I, HUVENNE H, KANGINAKUDRU S, ALBRECHTSEN M, AN C, AYMERIC J L, BARTHEL A, 2011. RNA interference in Lepidoptera: an overview of successful and unsuccessful studies and implications for experimental design. *Journal of Insect Physiology*, 57: 231–245.
- TOMARI Y, ZAMORE P D, 2005. Perspective: machines for RNAi. *Genes & Development*, 19: 517–529.
- UPADHYAY S K, CHANDRASHEKAR K, THAKUR N, VERMA P C, BORGIO J F, SINGH P K, TULI R, 2011. RNA interference for the control of whiteflies (*Bemisia tabaci*) by oral route. *Journal of Biosciences*, 36: 153–161.
- VACHON V, LAPRADE R, SCHWARTZ J L, 2012. Current models of the mode of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins: a critical review. *Journal of Invertebrate Pathology*, 111: 1–12.
- WANG L, LI Z, LU M, WANG Y, 2017. ThNAC13, a NAC transcription factor from *Tamarix hispida*, confers salt and osmotic stress tolerance to transgenic tamarix and arabidopsis. *Frontiers in Plant Science*, 8: 1–13.
- WHYARD S, SINGH A D, WONG S, 2009. Ingested double-stranded RNAs can act as species-specific insecticides. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 39: 824–832.
- WYNANT N, VERLINDEN H, BREUGELMANS B, SIMONET G, VANDEN B J, 2012. Tissue-dependence and sensitivity of the systemic RNA interference response in the desert locust, *Schistocerca gregaria*. *Insect Biochemistry & Molecular Biology*, 42: 911–917.
- YANG M, ZHAO L, SHEN Q, XIE G, WANG S, TANG B, 2017. Knockdown of two trehalose-6-phosphate synthases severely affects chitin metabolism gene expression in the brown planthopper *Nilaparvata lugens*. *Pest Management Science*, 73: 206–216.
- YOGINDRAN S, RAJAM M V, 2016. Artificial miRNA-mediated silencing of ecdysone receptor (EcR) affects larval development and oogenesis in *Helicoverpa armigera*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 77: 21–30.
- ZHU F, XU J, PALLI R, FERGUSON J, PALLI S R, 2011. Ingested RNA interference for managing the populations of the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*. *Pest Management Science*, 67: 175–182.
- ZOTTI M, DOS SANTOS E A, CAGLIARI D, CHRISTIAENS O, TANING C N T, SMAGGHE G, 2018. RNA interference technology in crop protection against arthropod pests, pathogens and nematodes. *Pest Management Science*, 74: 1239–1250.

(责任编辑:郭莹)