

转基因植物对传粉蜂类影响的研究进展

刘 标^{1,2}, 许崇任¹

(1. 北京大学生命科学学院, 北京 100871; 2. 国家环境保护总局南京环境科学研究所, 南京 210042)

摘要:随着转基因作物的大规模商业种植, 其对非靶生物的安全性问题已经成为转基因生物风险评估的重要内容。有些转基因植物是需要蜂类传粉的显花植物, 有些则可作为蜂类的食物来源。抗性转基因植物可能对蜂类产生直接和间接的影响。转基因植物的花粉或者花蜜可能对蜂类产生直接影响, 测试化学杀虫剂安全性的相同方法被用来评估这种影响。很多研究测试了纯化的转基因蛋白质(如 Bt, 蛋白酶抑制剂)对蜜蜂和熊蜂的影响。间接影响来自于遗传转化可能使转基因植物的表型产生的异常变化, 特别是花的改变。这种影响是用转基因植物进行评估的。转基因植物对蜂类的影响研究所测定的参数包括蜂类的肠道生理、取食和嗅觉学习行为、经口毒性和寿命等。对在实验室中以幼蜂或者成年蜂为对象、在封闭条件下针对蜂群的研究以及蜂类在转基因植物上的取食行为方面的研究进行了总结。结果表明, 转基因植物是否对传粉蜂类产生影响以及影响的大小主要取决于转基因植物的生物学特征、转基因蛋白的性质和表达量。一般来说, Bt 毒素蛋白和葡聚糖酶等蛋白质对蜂类没有影响, 而某些蛋白酶抑制剂和几丁质酶则可能对蜂类产生不利影响, 蜂类所摄取到这类蛋白质的剂量将决定影响的程度。然而, 由于采用的研究方法各不相同, 难以对不同的研究结果进行分析和比较, 并得出明确的结论。

关键词:转基因植物; 传粉蜂类; 生物安全

Research progress on the impacts of transgenic resistant plants on pollinating bees

LIU Biao^{1,2}, XU Chong-Ren¹ (1. Department of Environmental Biology and Ecology, College of Life Sciences, Peking University, Beijing 100871, China; 2. Nanjing Institute of Environmental Sciences, State Environmental Protection Administration, Nanjing 210042, China). *Acta Ecologica Sinica*, 2003, 23(5): 946~955.

Abstract: With the commercial planting of transgenic plants on a large scale, their impacts on non-target organisms have become an important part of risk assessment of transgenic organisms. The flowers of many transgenic plants are phanerogams that require bees for pollination. Some transgenic plants do not need bee pollination but are important food sources for bees. Transgenic plants with resistance traits may have direct or indirect effects on bees. Direct effects may arise upon ingestion of transgene products (proteins) if they are expressed in pollen or nectar. Methodologies to test chemical pesticides are used to evaluate the direct effects. Many studies have been conducted on the impacts of purified transgene product ingestion on

基金项目:国家重点基础研究发展规划资助项目(G2000046803);“十五”国家重点科技攻关资助项目(2001BA611B-06);国家研究与开发专项资助项目(J00-C-004);UNEP/GEF 中国国家生物安全框架实施资助项目(GF/2716-02-4538)

收稿日期:2002-07-28; **修订日期:**2002-11-10

作者简介:刘标(1969~),男,江苏南京市人,博士生,主要从事生物安全研究。

感谢英国 Sheffield 大学动物和植物科学系的 Nicolas Chaline 博士为本文提供的宝贵资料。

Foundation item: the State Key Basic Research and Development Plan(No. G2000046803), the Fifteenth State Key Project of Science and Technology(2001BA611B-06)and Special State Project of Research and Development (No. J00-C-004), and the Support for the Implementation of the National Biosafety Framework for China (GF/2716-02-4538)

Received date 万方数据 **Accepted date:** 2002-11-10

Biography: LIU Biao, Ph. D. candidate, mainly engaged in the study on non-target effects of transgenic organisms.

honey bees (*Apis mellifera*) and bumblebees (*Bombus terrestris*). The action mechanisms of several transgene products, such as Bt, protease inhibitor, chitinase and glucanase, are discussed. Indirect effects may occur if plant transformation results in unexpected changes in the plant's phenotype, especially the changes in flower phenotype. Tests with whole transgenic plants have been conducted to assess the indirect effects. The indices measured include bee gut physiology, food consumption, olfactory learning behavior, oral toxicity and longevity. Most tests have been conducted in the laboratory with individual larvae or adult bees. There have also been some tests with colonies under containment and observations of bee foraging on transgenic plants and these are summarised. The results so far suggest that whether transgenic plants would have impacts on pollinating bees and the extent of the impacts depend largely on the biological characteristics of the transgenic plants, the traits of transgene proteins expressed, and the expression of transgene proteins in the parts of the transgenic plants ingested by bees. Generally, proteins such as lepidopteran-specific Bt toxins and glucan-degrading enzymes have no effects on bees. Proteins that target more general aspects of insect biology, such as protease inhibitors (PI) or chitinases, have been demonstrated to have some adverse impacts on bees. The dosage of transgene products ingested by the bee will determine the extent of such effects. However, it has been difficult to analyze and compare different results and to reach a definite conclusion, because different methods were adopted in these studies. Technical standards for evaluating the impacts of transgenic plants on bees need to be developed and refined.

Key words: transgenic plants; pollinating bees; biosafety

文章编号:1000-0933(2003)05-0946-10 中图分类号:Q948.12⁺2.6 文献标识码:A

从 1996 到 2001 年,全球转基因作物商业种植规模从 1996 年的 170 万 hm^2 增长到 2001 年的 5260 万 hm^2 ,今后还将继续快速增加^[1]。自然界显花植物中的 75%~85% 是由虫媒花,一些转基因植物或者需要蜂类的传粉(如西红柿、油菜),或者可以作为蜜蜂的食物来源。随着转基因植物种类的增加和种植面积的迅速扩大,蜂类等传粉昆虫受到其影响的可能性也越来越大,科学家们已经在评估转基因植物对蜂类的安全性方面开展了很多研究工作。根据 James 的统计^[1],目前世界上大规模商业种植的几乎全部是具有抗性(抗除草剂、抗虫、抗病毒)性状的转基因作物。另外,从理论上分析,其他性状(如品质改良)的转基因植物对传粉蜂类产生不利影响的可能性要小于抗性转基因植物。因此,研究的重点是抗性转基因植物,尤其是抗虫转基因植物对传粉蜂类的影响。

1 抗性蛋白质的种类及抗虫机理

1.1 Bt 内毒素蛋白

苏云金杆菌(*Bacillus thuringiensis*, Bt)是一种革兰氏阳性土壤微生物。在形成芽孢的过程中,它可以产生对某些昆虫有毒杀活性的伴胞晶体,即 δ -内毒素蛋白。不同亚种的苏云金杆菌产生不同种类的 δ -内毒素蛋白,可特异性地杀死特定种类的昆虫。例如 Cry1 蛋白对鳞翅目昆虫有杀虫活性,Cry2 蛋白则可杀死鳞翅目和双翅目昆虫^[2]。苏云金杆菌制剂作为生物杀虫剂用于防治农业害虫已经有 40 多年的历史,其对膜翅目昆虫没有毒杀活性,因此对蜂类是安全的^[3]。然而,转 Bt 基因抗虫植物中所表达的是一种活化状态的毒素蛋白,与苏云金杆菌制剂的杀虫机理有较大不同^[4,5]。由于转 Bt 基因的抗虫棉花和玉米等已经分别在我国和其他很多国家进行大规模的商业种植,因此,非常必要测试转 Bt 基因抗虫植物对蜜蜂等膜翅目昆虫的安全性^[4]。

1.2 蛋白酶抑制剂(protease inhibitors, PIs)

蛋白酶抑制剂能够与昆虫消化道内的蛋白酶结合形成酶-抑制剂复合物(E-I),阻断或减弱蛋白酶的蛋白水解作用,影响蛋白的正常消化,同时,E-I 复合物能够刺激蛋白酶的过量分泌,使昆虫产生厌食反应,最终造成昆虫的非正常发育或者死亡^[6]。由于其作用机理是分子与分子之间的结合,所以,它对昆虫的

影响程度常常与所使用的 PIs 剂量密切相关。蛋白酶抑制剂有多种类型,其中与抗虫性关系最密切的是丝氨酸蛋白酶抑制剂。丝氨酸蛋白酶抑制剂又分为胰蛋白酶抑制剂、胰凝乳蛋白酶抑制剂和弹性蛋白酶抑制剂。蜜蜂、熊蜂及大多数昆虫均利用胰蛋白酶消化食物。植物遗传转化中所使用的丝氨酸蛋白酶抑制剂有包曼-伯克(Bowman-Birk)大豆胰蛋白酶抑制剂(BBI)、胰蛋白酶抑制剂(BPTI)、大豆胰蛋白酶抑制剂(SBTI)、马铃薯蛋白酶抑制剂(POT-1 和 POT-2)、豇豆蛋白酶抑制剂(CpTI)等^[7]。

1.3 几丁质酶(chitinase)

几丁质酶可降解几丁质,而几丁质是真菌和昆虫的重要结构成分之一,所以,利用基因工程技术将带有强启动子的几丁质酶基因转入植物,可有效增强植物的抗病和抗虫性,这方面的研究近年来已取得显著进展^[8]。由于几丁质是蜜蜂和熊蜂的消化道和体壁的重要组成部分之一^[9],所以,蜜蜂和熊蜂可能受到转基因植物中表达的几丁质酶的影响。

1.4 β -1,3 葡聚糖酶(glucanase)

β -1,3-葡聚糖酶能催化 β -1,3-葡聚糖多聚体(大多数植物病原真菌细胞壁的主要成份之一)的水解,从而抑制真菌的生长与增殖,已有试验证明转 β -1,3-葡聚糖酶基因植物可以增强对特定病原真菌的抗性^[10]。由于至今尚未在昆虫中发现 β -1,3 葡聚糖,所以, β -1,3 葡聚糖酶在理论上对于蜂类是安全的。

1.5 分解除草剂的酶

抗除草剂性状的获得是通过使植物产生一种能够分解除草剂的酶来实现的^[11],而蜂类身体的成分中缺乏这种酶的底物-除草剂,所以,这种酶在理论上不会对蜂类产生不利影响。

2 抗性转基因植物对蜂类影响的研究进展

抗性转基因植物对非靶生物的安全性研究应分 3 个层次(tier)进行。第一个层次是在实验室中研究(laboratory scale),其次是在封闭的温室或者小规模的大田受控条件下的半大田(semi-field scale)研究,第 3 个层次是在大规模的大田(field scale)环境下的研究^①。抗性转基因植物对蜂类影响的研究也主要在这 3 个层次上进行,以下是主要的研究结果。

2.1 实验室层次上的研究

2.1.1 Bt 内毒素蛋白 Sims 用浓度为 $20\mu\text{g}/\text{ml}$ 的纯化 Cry1Ac 毒素蛋白制剂饲喂意大利蜂(*Apis mellifera*)的幼虫和成虫,这个浓度高于大田种植的转基因棉花花粉和花蜜中 Cry1Ac 表达量的 100 倍,但是处理组蜜蜂的死亡率与对照组之间没有出现显著差别^[12]。

根据 USEPA 公布的资料,当以相当于转基因抗虫棉花的花粉和花蜜中 Cry1Ac 表达水平的 1700 倍或者 10000 倍的该毒素蛋白饲喂蜜蜂的幼虫和成虫时,没有发现受试蜜蜂出现中毒症状;同样,也没有发现 Cry1Ab 和 Cry9C 毒素蛋白对蜜蜂的幼虫和成虫有毒性^[13]。

Malone 等将 Cry1Ba 活性毒素蛋白分别以 $10\text{ mg}/\text{g}$ 、 $2.5\text{ mg}/\text{g}$ 和 $0.25\text{ mg}/\text{g}$ 的浓度混入人工配制的花粉食物中饲喂蜜蜂成虫 7 d,然后将受试蜜蜂放回各自的蜂房中进行常规喂养。结果发现,处理组与对照组蜜蜂在食物消耗速度和存活率上没有显著差异^[14]。用同样的方法测试了浓度为 $0.625\text{ mg}/\text{g}$ 的 Cry1Ba 活性毒素蛋白对蜜蜂成虫的影响,结果发现蜜蜂的寿命和飞行能力没有受到不良影响^[15]。

受 Novartis 公司委托,加利福尼亚农业研究所的研究人员测试了转基因玉米花粉对蜜蜂的安全性。将 Bt-176 转基因玉米的花粉混入水中作为唯一食物饲喂意大利蜂 4 龄幼虫,使每头幼虫摄入的花粉分别为 1 mg 和 2 mg ,并设非转基因母本玉米的花粉、水和加入了杀虫剂的非转基因母本玉米花粉 3 个对照,持续饲喂 45min,测定幼虫摄入两种花粉后的羽化率。结果处理组幼虫的羽化率与非转基因母本玉米花粉的对照组之间没有显著差异,而显著高于其余两对照组幼虫的羽化率,作者据此认为该转基因玉米对蜜蜂幼虫的发育没有明显的(measurable)不利影响^[16]。

2.1.2 蛋白酶抑制剂基因 Belzunces 等将纯化的 BBI 以 $1\text{ mg}/\text{g}$ 、 $0.1\text{ mg}/\text{g}$ 、 $0.01\text{ mg}/\text{g}$ 和 $0.001\text{ mg}/\text{g}$ 比

例拌入糖浆中饲喂觅食工蜂(foraging honeybee),4d 后没有发现蜜蜂的存活率受到影响。然而,处理组工蜂在 3.5d 时的胰蛋白酶活性与对照组相比有很大不同:0.001mg/g 浓度组工蜂的胰蛋白酶活性升高,而其余两个浓度组(0.1mg/g, 0.01mg/g)工蜂的胰蛋白酶活性则显著下降^[17]。

Malone^[18]和 Burgess 等^[19]用相同的方法测试了不同浓度的 BPTI 和 SBTI 两种蛋白酶抑制剂对蜜蜂的安全性。将 BPTI 和 SBTI 两种蛋白酶抑制剂按照不同浓度(1.0%、0.5%、0.1%、0.01%和 0.001% (w:v))混入蔗糖溶液中,饲喂初孵(newly-emerged)成年蜜蜂。结果发现高浓度(1.0%、0.5%、0.1%)处理组蜜蜂的死亡率显著高于对照组蜜蜂,而低浓度(0.01%, 0.001%)蛋白酶抑制剂则不对工蜂的寿命产生明显影响。此外,分别在饲喂后的第 8 天和 75%的处理组蜜蜂死亡两个时间点测定存活蜜蜂中肠 3 种内切蛋白酶(胰蛋白酶、糜蛋白酶、弹性蛋白酶)和一种外切蛋白酶(亮氨酸氨肽酶,LAP)的活性。结果发现所有浓度的两种蛋白酶抑制剂都使 LAP 活性显著高于对照组;3 种内切蛋白酶活性与对照组相比也有显著差异;饲喂后第 8 天,所有浓度的 BPTI 处理组的 3 种内切蛋白酶活性都比对照组显著降低;而当 75%处理组蜜蜂死亡时,所有浓度的 BPTI 都使处理组胰蛋白酶活性较对照组显著降低;对于 SBTI,在两个时间点上都是最高剂量使处理组蜜蜂的 3 种内切蛋白酶活性显著降低。

Picard-Nizou^[20]等用 CpTI 进行了蜜蜂的急性毒性试验(包括饲喂试验和注射试验两部分),并通过条件喙伸展试验(conditioned proboscis extension assay)研究了其对蜜蜂的嗅觉学习行为的影响。将 CpTI 溶解在蔗糖溶液中,用 2 种农药做阳性对照。在饲喂试验中,让每个蜜蜂摄取 20 μ g 的 CpTI,记录饲喂开始后 24h 和 48h 的死亡率;腹部注射试验中,每个蜜蜂接受的 CpTI 量为 0.5 μ g,记录注射后 24h 和 48h 的死亡率。结果 CpTI 在两种试验中都没有显示出对蜜蜂的毒性效应。但是,CpTI 对蜜蜂的嗅觉学习行为有不利影响。这个结果有待于在大田中用转基因植物的试验结果进行验证。

Malone 等^[21]将 POT-1 和 POT-2 按照不同比例混入糖浆(浓度分别为 0.2%和 0.01%)或人工食物(浓度分别为 1%和 0.2%)中饲喂初孵工蜂,8d 后改喂对照组食物。结果食用含 1%抑制剂的人工食物和含 0.2%抑制剂的糖浆的工蜂寿命显著降低,而较低浓度的抑制剂则对工蜂寿命没有显著影响。另外,第 3 天和第 8 天的弹性蛋白酶活性没有显著变化,而第 8 天的其它两种内切蛋白酶和一种外切蛋白酶的活性都显著低于第 3 天;除了含 0.01%POT-1 的糖浆之外,在两个时间点上所有浓度的两种蛋白酶抑制剂都使存活的处理组工蜂中肠 3 种内切蛋白酶的活性显著降低。

Girard 等采用评价化学品对蜜蜂的经口急性毒性的试验方法,测定了 3 种蛋白酶抑制剂(水稻半胱氨酸蛋白酶抑制剂 OC-I、BBI 和鸡蛋白半胱氨酸蛋白酶抑制剂)对意大利蜂工蜂的急性毒性效应。将这 3 种蛋白酶抑制剂加入到蔗糖溶液中(浓度均为 330 μ g/ml),让 30 只 15 日龄蜜蜂在 24h 内摄取 1ml 该溶液,之后改喂没有蛋白酶抑制剂的蔗糖溶液。结果显示,与不含蛋白酶抑制剂的对照组相比,所有处理组蜜蜂在 24h 内摄取的食物量及其死亡率都没有显著差异。同时作者还发现鸡蛋白半胱氨酸蛋白酶抑制剂和 BBI 没有使蜜蜂的嗅觉学习行为发生改变,BBI 和 OC-I 也没有改变中肠消化酶的总活性,但是 BBI 诱导产生了一种新的蛋白酶^[22]。

Pham-Delegue 等将 SBTI 和 BBI 溶于蔗糖溶液中,饲喂刚羽化的意大利蜂工蜂。每天记录笼中死亡的个体数目,直到所有蜜蜂全部死亡。结果显示,对于 SBTI,0.1 和 1mg/ml 浓度处理组的蜜蜂的死亡率显著高于对照,而 1mg/ml 的 BBI 组蜜蜂的死亡率明显高于对照。0.1 和 1mg/ml 组的 BBI 和 SBTI 增加蜜蜂中肠的蛋白酶活性:0.1 和 1mg/ml 浓度组的胰蛋白酶活性都显著增加,而其他酶的活性只有在最高的 1mg/ml 浓度组才显著增加。另外,还发现处理组蜜蜂中肠产生了新的蛋白酶,而且这些新产生的蛋白酶仍然对 BBI 和 SBTI 敏感。作者认为取食 BBI 和 SBTI 使蜜蜂额外产生的蛋白酶来自其体内蛋白质的大量分解,使蜜蜂的死亡率增加。作者还在第 15 天进行蜜蜂的条件喙伸展试验,结果表明,1mg/ml 的 BBI 显著降低蜜蜂的嗅觉学习行为,而 SBTI 和另外两个浓度的 BBI 则对蜜蜂的嗅觉学习行为没有显著的影响^[23]。

Malone 等测试了 4 种蛋白酶抑制剂(BPTI,SBTI,POT-1 和 POT-2)对熊蜂的安全性。结果发现不同蛋白酶抑制剂对熊蜂的影响是不一样的:所有浓度的 BPTI 对熊蜂的死亡率都没有显著的影响;SBTI (10 mg/g)和 POT-1(5 mg/g 和 10 mg/g)显著地增加雄蜂的死亡率;10 mg/g 组的 POT-2 引起的死亡率

显著地高于 0.1 mg/g 和 0.01 mg/g 组的死亡率。在熊蜂中肠蛋白酶活性方面, LAP 的活性不受 4 种蛋白酶抑制剂的影响; 弹性蛋白酶活性受到所有浓度的 POT-1 和 POT-2 的强烈抑制, 而 SBTI 也显著地抑制该酶活性, 且抑制的程度与 SBTI 的剂量有很好的相关性, 而 BPTI 对该酶没有抑制活性; 糜蛋白酶活性也受到所有浓度 POT-1 和 POT-2 的强烈抑制, 但只受到最高浓度 SBTI 的抑制, 不受 BPTI 的抑制。胰蛋白酶活性受到全部 4 种蛋白酶抑制剂的抑制^[24]。Arruego 等用 3 个浓度(10, 100, 1000 $\mu\text{g/ml}$)的 BBI 饲喂熊蜂, 发现短期内对熊蜂的死亡率和嗅觉学习行为没有显著影响^[25]。

2.1.3 几丁质酶基因和 β -1,3 葡聚糖酶基因 Picard-Nizou 等用与测试 CpTI 对蜜蜂安全性的相同方法测试了几丁质酶和 β -1,3 葡聚糖酶对蜜蜂的影响。在腹部注射试验中, 使每个蜜蜂接受 1.69 μg 的几丁质酶和 0.3 μg 的 β -1,3 葡聚糖酶外, 饲喂实验中让每个蜜蜂各摄取 20 μg 的几丁质酶和 β -1,3 葡聚糖酶。结果发现 2 种蛋白酶抑制剂都没有显示出对蜜蜂的毒性效应, 对蜜蜂的嗅觉学习行为也没有明显影响^[20]。

2.2 半大田层次上的研究

2.2.1 Bt 内毒素蛋白 Arpaia 用含有浓度分别为 0.066% 和 0.332% Cry3B 蛋白的糖浆在模拟大田条件下饲喂蜜蜂蜂群(colony), 同时蜜蜂可以自由采集环境中的植物花粉, 试验持续了 58d。糖浆中的 Cry3B 蛋白浓度相当于转 Bt 基因玉米花粉中 Bt 蛋白表达量的 400 倍和 2000 倍。试验结果显示, 处理组蜜蜂幼虫的死亡率和干重与对照组没有显著差别, 两组蜂群的健康状况也没有显著差异。作者认为蜜蜂取食转 Cry3B 基因作物的花粉是没有危险的^[26]。

Schur 等用塑料网将大田中部分转 Bt Cry1Ab 基因玉米罩成密闭的帐篷, 将一个蜂群放入帐篷内, 对照组是非转基因玉米。结果发现在玉米花粉散播的 7d 内, 转基因玉米花粉对蜜蜂的存活率、取食频率和行为以及蜂巢的发育(brood development)状况无不利影响; 然后将蜂群从帐篷中取出, 在随后的 30d 内也没有发现转基因玉米花粉对蜂群的蜂巢发育状况有不利影响^[27]。

2.2.2 蛋白酶抑制剂基因 Grallien 等在封闭的人工气候室中种植了 5 株转 OC-I 基因抗虫油菜和 5 株非转基因油菜, 在油菜花期将一个蜜蜂蜂群放到其中, 蜜蜂可以在室中自由地飞行和采集花粉和花蜜, 结果显示蜜蜂在两种油菜上的采集行为没有显著差别。另外, 还用摄象机记录了蜜蜂个体在两种油菜上的采集行为, 发现蜜蜂在两种油菜上的总停留时间和访问每朵花的平均时间都没有显著差异, 但是蜜蜂在转基因油菜上的搜寻频率(frequency of searching event)高于非转基因油菜^[28]。

2.2.3 几丁质酶基因 Picard-Nizou 等在室内和室外试验了两种转几丁质酶基因抗病油菜对蜜蜂取食行为的影响, 该转基因油菜叶片中表达的几丁质量是对照的 20 多倍。它们将 5 株转基因和 5 株非转基因油菜同时放在封闭的环境中, 记录访问了 2 种油菜花的蜜蜂总数量和被蜜蜂访问的两种油菜花的数目, 结果发现无论在室内还是在室外, 5 株转基因油菜与 5 株非转基因油菜上蜜蜂的访问次数之间没有显著差异, 转基因抗病油菜没有对蜜蜂的取食选择行为产生不利影响。用摄象机记录蜜蜂个体在两种油菜上的取食行为, 发现在被每个蜜蜂访问的油菜花的数目、每个蜜蜂在两种油菜花上停留的时间方面都没有显著差别, 即遗传转化没有影响到蜜蜂的取食行为^[29]。

2.2.4 抗除草剂基因 Chaline 等在半大田条件下测试了转草丁膦(glyphosate)基因抗除草剂油菜对蜜蜂蜂群的影响。将蜂群分别与转基因油菜、对照非转基因油菜以及含有转基因和非转基因两种油菜放在封闭的温室中。实验结果表明蜜蜂在两种油菜上的死亡率、采集行为、取食偏爱(foraging preference)和蜂群健康状况(包括种群数目、巢区、感病情况和蜂巢中的食物储藏量)都没有显著差别^[30]。

2.3 大田层次上的研究

与实验室和半大田层次的实验相比, 大田层次的研究是在最接近真实环境的条件下进行的, 因此, 研究结果的可靠性是最高的。但是, 由于大田条件的复杂多变和不容易控制, 大田研究的结果往往难以重复。另外, 由于研究过程中的不可控因素过多, 实验结果的解释也很困难。关于在大田层次上进行的转基因植物对蜜蜂的安全性研究, 至今没有见到正式报道。

3 问题与讨论

3.1 转基因植物对蜂类的影响

作为重要的传粉昆虫,蜂类不仅在维护自然及农田生态系统的多样性和稳定性方面发挥重要作用,而且其传粉的成功与否直接或间接地影响到一些作物的产量和质量,具有重大的经济价值^[31]。一旦蜂类的生存受到影响,不仅会造成重大的经济损失,而且可能通过食物链的营养关系或者其他非营养关系而引起生态系统中其他生物的连锁不利反应,从而影响生态系统的多样性和稳定性。因此,研究转基因植物对蜂类的影响具有重要的意义^[32]。

转基因植物对传粉蜂类的影响可分为直接影响和间接影响两类。直接影响是由蜂类取食了转基因植物的花粉、花蜜中转基因(transgene)蛋白质而引起的,影响的大小取决于转基因表达产物的性质以及蜂类可能取食到的转基因蛋白质的量。一般来说,花粉中蛋白质的含量为8%~40%,而花蜜是植物的分泌物,其中蛋白质含量极小。所以,在蜂类取食的植物各部分中,花粉中转基因表达产物的数量可能是最大的。另外,遗传转化会使转基因植物发生表型方面的某些意外变化,这些变化对蜂类的影响叫做间接影响。例如,转基因抗除草剂油菜的花蜜和花粉对蜂类的营养价值是否改变,其中是否会产生一些蜂类不喜欢甚至对蜂类有害的物质,从而影响蜂类的生长和传粉行为。

迄今用纯化的转基因蛋白质对蜂类的安全性试验结果表明,某些种类的PIs(如POT)会对蜂类的生存、中肠蛋白酶活性和嗅觉学习行为等产生不良影响。在这种情况下,转基因植物中这类蛋白质的表达量将是蜂类是否会受到不良影响的决定因素之一。而另外一些PIs(如OC-I)和Bt活性毒素以及转Bt基因玉米花粉,无论摄入的剂量多么大,都不会对蜂类的生存和活性产生危害。至于抗性转基因植物对蜂类的间接影响,研究内容集中在转基因植物是否对蜜蜂的取食偏向产生影响,目前还没有发现蜜蜂两种植物上的取食行为有显著差异。

可见,转基因植物是否对蜂类产生影响以及影响的大小与转基因植物的生物学特征、转基因的类型和性质、转基因在植物不同部位的表达特异性及表达量等密切相关。因此,在转基因生物的安全性评价研究中,坚持逐案(case by case)原则是非常必要的^[33]。

3.2 评价转基因植物对蜂类影响的技术准则

转基因植物对蜂类的影响是转基因生物引起的非靶效应的一部分,而目前还没有国际公认的测试非靶效应的类型和程度方面的技术准则。目前研究转基因生物的非靶效应基本上借鉴了在化学品的非靶效应研究中建立起来的技术准则。Dohmen提出了由3个层次的试验组成的顺序测试方案(sequential testing scheme),用于检测杀虫剂对有益昆虫的影响^[34]。在该方案中,首先在“最恶劣情况”(worst case scenario)下进行第一层次的实验室研究。如果在该层次的试验中没有观察到不利影响,则可预测该物质在大田条件下不可能对非靶生物产生不利影响。如果在第一层次的试验中发现了不利影响,则需要进一步的试验。但是,由于实验室中的极端条件与大田情况之间存在很大差别,难以根据实验室的实验结果预测大田中是否会产生不利影响。第二个层次是在更加接近真实情况的实验室、温室或者在半大田条件下进行研究。如果在第二层次试验中发现了不利影响,则需要真实的大田条件下(第三层次)对该物质的影响进行研究和调查。

一些研究人员认为上述顺序试验方案可用于测试转基因植物对非靶生物的影响^[20]。在上述转基因植物对蜂类影响的研究中,第一层次研究用含有极高浓度的转基因蛋白质的食物进行蜂类的经口和接触毒性试验以及其他试验;第二层次在封闭的温室或者在小的田块中用转基因植物进行实验。第三层次的实验应该在自然条件下较大规模地种植转基因植物和适当的对照植物,再加上能够代表实际农田实践的对照,如用喷洒农药的方法杀灭非抗虫棉花上的害虫^[35]。

Hilbeck等科学家认为不能把测试化学品的技术原封不动地用于转基因植物的非靶效应研究^[36]。对于蜜蜂来说,化学品和转基因植物对其影响的方式是不同的;化学品一般用于喷洒,蜜蜂可能受到的影响时间较短,但是暴露剂量大;而转基因植物的花粉和花蜜的产生时间长,蜜蜂在植物的整个开花期都可能受到影响,其影响时间也更长,但暴露剂量相对较小。所以,转基因植物对蜜蜂影响的研究技术中还有很多问题需要解决

万方数据

转基因生物体不仅可能对生态环境产生潜在的不利影响,而且还可能对人体健康、社会经济等方面产

生负面影响^[37],特别是转基因作物的大规模商业化种植还关系到有关国家的经济利益;再者,活生物体具有运动和通过繁殖扩大其种群的能力,具有不利生态影响的转基因活生物体一旦释放到环境中,其影响将跨越地理和政治边界,所以,尽快建立被广泛接受的评价转基因生物安全性的国际规范具有重大意义^[38]。关于评价转基因植物对蜜蜂的安全性的技术标准,应对实验所涉及的模式生物的种类和年龄、测试基质、受试物的添加方式和剂量、试验持续时间、饲养条件等关键环节进行严格界定。标准中每个层次实验的设计要以转基因蛋白的作用机理以及暴露途径为依据,既具有严格的科学性和可操作性,又要能够满足生物安全管理法规的有关需要。

3.3 转基因植物对蜂类影响的研究展望

自从基因工程技术诞生以来,转基因生物的安全性问题就一直备受世人关注^[39,40]。Jepson 等将转基因生物所引起的生态风险定义为释放的新物质通过对群落或者生态系统的功能产生急性、慢性、生殖等方面的影响甚至破坏等不利影响的可能性,如可能导致非靶生物种群的死亡或者减少^[41]。自从 Losey 等关于转 Bt 基因玉米花粉使黑脉金斑蝶(Monarch butterfly)幼虫死亡率显著增加的报道发表以来^[42],公众和科学家们从不同角度对该报道进行了评论^[43,44],而转基因生物的非靶影响问题也因此成为新的研究热点,一些有价值的研究报告陆续发表出来^[45~54]。随着转基因植物商业化步伐的逐渐加快,转基因生物的非靶影响研究应该得到高度的重视。在转基因植物对蜜蜂的非靶效应方面已经有了一定的研究,但是仍然存在很多空白。今后还应该进行更加深入的研究,主要包括:

(1) 根据所测定的花粉、花蜜中转基因表达水平以及蜜蜂可能摄入的花粉、花蜜的数量,估算出成虫(包括工蜂、雄蜂和蜂王)和幼虫可能受到的最高暴露水平,并进而确定安全性试验的剂量。这是转基因植物对蜂类的安全性试验的关键。但是,已有的研究集中在抗性转基因植物的叶片中转基因蛋白质的表达量^[55],而缺乏花粉、花蜜中表达的转基因蛋白质表达量方面的资料。

(2) 关于实验室和半大田层次的急性毒性和半致死效应试验,应该用蜂类可能受到的最高暴露水平相对应的转基因蛋白质测定其对幼虫(主要是生存和生长)、工蜂成虫(主要是生存、发育,特别是舌下腺的发育,以及行为的影响,特别是取食行为)、蜂王(主要是生存、生育和产生外激素能力)和雄蜂(主要是生存和产生精子能力)的影响^[56]。

(3) 由于纯化的转基因蛋白不能代替转基因植物中实际表达的转基因蛋白,而且有些转基因植物同时转入了多个转基因^[57],所以,今后应该更多地直接使用转基因植物材料进行蜂类的安全性试验,以对第一和第二层次的试验结果进行验证,并将实验结果与转基因作物的替代物(如生物杀虫剂、化学杀虫剂和除草剂等)可能对蜂类造成的风险进行比较。

(4) 测定转基因植物的花(花蜜的数量、含糖量,花的结构等)对蜜蜂的吸引力是否变化。

(5) 冬季的蜜蜂生活在蜂巢内,并在其中养育后代,在此期间全部上个季节采集的花粉和花蜜为食。研究表明,花粉和花蜜中的蛋白质可以在蜂巢中保持稳定达数周^[58]。所以,蜜蜂的幼虫和成虫可能受到转基因植物的长期影响。今后应该进行小剂量的慢性毒性试验,而且应该测试转基因植物对 2 个甚至更多世代蜜蜂的安全性。

虽然目前已经在转基因植物对蜂类的安全性评价方面开展了很多工作,并得到了一些研究成果,但是由于所采用的研究方法各不相同,很难对不同研究的结果进行解释和比较。另外,转入植物的外源基因不同,对传粉蜂类的影响也不同。所以,目前还无法根据已有的研究结果得出转基因植物对蜂类安全性的最终结论。

References:

- [1] Clive James. Global Review of Commercialized Transgenic Crops; ISAAA Briefs No. 24, 2001.
- [2] Travis Glare, O'Callaghan M. *Bacillus thuringiensis*: biology, ecology and safety. John Willey & Sons, Ltd., 2000. 万方数据
- [3] Yu Z N. *Bacillus thuringiensis*. Beijing: Science Press, 1990. 399~420.

- [4] Mang K Q. Discussion on the biosafety of transgenic plants. *Progress in Biotechnology*, 1996, **4**: 2~6.
- [5] Cui H Z, Guo S D. Insect-resistance transgenic plant transformed with Bt genes. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 1998, **6**(2): 166~172.
- [6] Liu W G, Xue Q Z. Proteinase inhibitors and their application in insect-resistant gene engineering. *Biotechnology Information*, 2000, **1**: 20~25.
- [7] Li H Y, Zhu Y M, Ma F M. Progress on transgenic insect resistance plants. *Journal of Northeast Agricultural University*, 2000, **31**(4): 399~405.
- [8] Ouyang S W, Xie B Y, Zhao K J, *et al.* Advances in chitinase genes transformation. *Biotechnology Information*, 2001, **3**: 28~31.
- [9] Kramer K J, Muthukrishnan S. Insect chitinases: molecular biology and potential use as biopesticides. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 1997, **27**: 887~900.
- [10] Cai Y F, Ye P S, Zhang L, *et al.* β -1,3 glucanase and its utilization in developing transgenic plant resistant to fungal pathogens. *Southwest Chinese Journal of Agricultural Sciences*, 2001, **14**(2): 78~81.
- [11] Lian X L, Wang Y B, Wei J Q, *et al.* The progress of studies on herbicide resistance gene of crop. *Biotechnology Information*, 2001, **2**: 17~21.
- [12] Sims S R. *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (CryIA (c)) protein expressed in transgenic cotton: effects on beneficial and other non-target insects. *Southwestern Entomologist*, 1995, **20**(4): 493~500.
- [13] Anon. Bt Plant-Incorporated Protectants October 15, 2001 Biopesticides Registration Action Document, United States Environmental Protection Agency. http://www.epa.gov/opbtpd1/biopesticides/otherdocs/bt_brad2/3%20ecological.pdf.
- [14] Malone L A, Burgess E P J, Stefanovic D. Effects of a *Bacillus thuringiensis* toxin, two *Bacillus thuringiensis* biopesticide formulations, and a soybean trypsin inhibitor on honey bee (*Apis mellifera* L.) survival and food consumption. *Apidologie*, 1999, **30**: 465~473.
- [15] Malone L A, Burgess E P J, Heather S, *et al.* Effects of ingestion of a *Bacillus thuringiensis* toxin and a trypsin inhibitor on honey bee flight activity and longevity. *Apidologie*, 2001, **32**(1): 57~6.
- [16] Novartis. Bt-maize and non-target organisms: compilation of available data. 1999, www.bba.de/gentech/btmaize.pdf.
- [17] Belzunces L P, Lenfant C, Di Pasquale S, *et al.* In vivo and in vitro effects of wheat germ agglutinin and Bowman-Birk soybean trypsin inhibitor, two potential transgene products, on midgut esterase and protease activities from *Apis mellifera*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 1994, **109B**: 63~69.
- [18] Malone L A, Helen A G, Burgess E P J, *et al.* Toxicity of trypsin endopeptidase inhibitors to honey bees (*Hymenoptera: Apidae*). *Journal of Economic Entomology*, 1995, **88**(1): 46~50.
- [19] Burgess E P J, Malone L A, John T, *et al.* Effects of two proteinase inhibitors on the digestive enzymes and survival of honeybees (*Apis mellifera*). *Journal of Insect Physiology*, 1996, **42**(9): 823~828.
- [20] Picard-Nizou A L, Grison R O, Pioche C L, *et al.* Impact of proteins used in plant genetic engineering: Toxicity and behavioural study in the honeybee. *Journal of Economic Entomology*, 1997, **90**(6): 1710~1716.
- [21] Malone L A, Burgess E P J, Christeller J T, *et al.* In vivo responses of honey bee midgut proteases to two protease inhibitors from potato. *Journal of Insect Physiology*, 1998, **44**(2): 141~147.
- [22] Girard C, Picard-Nizou A L, Grallien E, *et al.* Effects of proteinase inhibitor ingestion on survival, learning abilities and digestive proteinases of the honeybee. *Transgenic Research*, 1998, **7**(4): 239~246.
- [23] Pham-Delegue M H, Girard C, Metayer M L, *et al.* Long-term effects of soybean protease inhibitors on digestive enzymes, survival and learning abilities of honeybees. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 2000, **95** (1): 21~29.
- [24] Malone L A, Burgess E P J, Stefanovic D, *et al.* Effects of four protease inhibitors on the survival of worker bumblebees *Bombus terrestris* L. *Apidologie*, 2000, **31**(1): 25~38.
- [25] Arruero X, Franceschi J, Picard-Nizou A L, *et al.* Impact of a proteinase inhibitor used in plant genetic

- engineering on bumblebees (*Bombus terrestris* L.). Bulletin OILB/SROP, 2000, **23** (9): 141~148.
- [26] Arpaia S. Ecological impacts of Bt-transgenic plants: 1. Assessing possible effects of CryIIIb on honey bee (*Apis mellifera* L.) colonies. *Journal of Genetics & Breeding*, 1996, **50**:315~319.
- [27] Schur A, Tornier I & Neumann C. Bt-Mais und non Bt-Mais: vergleichende Untersuchungen an Honigbienen (Tunnelzeltversuch). 47 th annual meeting of the institutes for bee research, April 3-5, 2000. B laubeuren bei Ulm, Germany Poster, 2000.
- [28] Grallien E, Marilleau R, Pham-Delegue M H, et al. Impact of pest insect resistant oilseed rape on honeybees, Proc. 9th Int Rapeseed Congr. "Rapeseed today and tomorrow", Cambridge, United Kingdom, 4-7 July 1995, 784~786.
- [29] Picard-Nizou A L, Pham-Delegue M H, Kerguelen V, et al. Foraging behaviour of honey bees (*Apis mellifera* L.) on transgenic oilseed rape (*Brassica napus* L. var. *oleifera*). *Transgenic Research*, 1995, **4**: 270~276.
- [30] Chaline N, Decourtye A, Marsault D, et al. 2001. Impact of novel herbicide-resistant transgenic oilseed rape on honey bee colonies in semi-field conditions. In: Hazards of pesticides to bees, Belzunces L P, Pélissier C, Lewis GB. (eds), 7th Int. Symp. ICP-BR Bee Protection Group, Avignon, 07-09 Sept 1999. Ed. INRA, Paris, 2001 (Les Colloques, n° 98), 187~193.
- [31] Zhang F X. *Modern apiculture production*. Beijing: Chinese Agricultural University Press, 1998. 330~332.
- [32] Engels Wolf. What are the possible effects of transgenic plant products on pollinators, especially bees? International workshop on transgenic plant resistance to insects, organized by BIOTREND, 1998. <http://www.biotrin.cz/enpages/effects-of.htm>.
- [33] State Environmental Administration Agency of China. *National Biosafety Framework of China*. Beijing: China Environmental Science Press, 2000.
- [34] Dohmen G P. Comparing pesticide effects on beneficials in a sequential testing scheme. in: Haskell P T, McEwen P, eds. *Ecotoxicology pesticides and beneficial organisms*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands, 1998. 191~200.
- [35] Andersson I, Brunius G, Hermansson M. Ecological risk assessment of transgenic organisms; Sweden. *Ambio*, 1992, **21**(7): 463~486.
- [36] Hilbeck A, Meier M S, Raps A. Review on non-target organisms and Bt-plants. EcoStrat GmbH, Zurich, 2000.
- [37] Liu B, Xue D Y. The resistance to biotechnology in Euro-America and its lessons. *Rural Eco-Environment*, 1998, **14**(4):46~49.
- [38] Tiedje J M, Colwell R K, Grossman Y L, et al. The planned introduction of genetically engineered organisms: ecological considerations and recommendations. *Ecology*, 1989, **70**(2): 298~315.
- [39] Ruibal M N L, Lints F A. Novel and transgenic food crops: Overview of scientific versus public perception. *Transgenic Research*, 1998, **7** (5): 379~386.
- [40] Wolfenbarger L L, Phifer P R. The ecological risks and benefits of genetically engineered plants. *Science*, 2000, **290**: 2088~2093.
- [41] Jepson P C, Croft B C, Pratt G E. Test systems to determine the ecological risks posed by toxin release from *Bacillus thuringiensis* genes in crop plants. *Molecular Ecology*, 1994, **3**:81~89.
- [42] Losey J E, Rayor L S, Carter M E. Transgenic pollen harms monarch larvae. *Nature*, 1999, **399**: 214.
- [43] Shelton A M, Sears M K. The monarch butterfly controversy: scientific interpretations of a phenomenon. *Plant Journal*, 2000, **27** (6):483~488.
- [44] Shelton A, Roush R. False reports and the ears of men. *Nature Biotechnology*, 1999, **17**: 832.
- [45] Cui J J, Xia J Y. Effects of transgenic Bt cotton on the population dynamic of natural enemies. *Acta Gossypii Sinica*, 1999, **11**(2):84~91.
- [46] Hilbeck A, Moar WJ, Pusztai-Carey M, et al. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* CryIAb toxin to the predator *Chrysopa* (Neuroptera: Chrysopidae). *Environmental Entomology*, 1998, **27**(5): 1255~1263.
- [47] Schuler T H, Denholm I, Jouanin L, et al. Population-scale laboratory studies of the effect of transgenic plants on

- nontarget insects. *Molecular Ecology*, 2001, **10**(7): 1845~1853.
- [48] Couty A, Down R E, Gatehouse A M R, *et al.* Effects of artificial diet containing GNA and GNA-expressing potatoes on the development of the aphid parasitoid *Aphidius ervi* Haliday (Hymenoptera: Aphidiidae). *Journal of Insect Physiology*, 2001, **47**(12): 1357~1366.
- [49] Jesse L C, Hansen O, John J. Field deposition of Bt transgenic corn pollen: lethal effects on the monarch butterfly. *Oecologia*, 2000, **125** (2): 241~248.
- [50] Pilcher C, Rice M, Obrycki J, *et al.* Field and laboratory evaluations of transgenic *Bacillus thuringiensis* corn on secondary Lepidopteran pests (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Economic Entomology*, 1997, **90**(2): 669~678.
- [51] Hilbeck A, Baumgartner M, Fried P M, *et al.* Effects of transgenic *Bacillus thuringiensis* corn-fed prey on mortality and development time of immature *Chrysoperla carnea* (Nuroptera: Chrysopidae). *Environmental Entomology*, 1998, **27**: 480~487.
- [52] Pimentel D S, Raven P H. Bt corn pollen impacts on nontarget Lepidoptera: assessment of effects in nature. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 2000, **97**(15): 8198~8199.
- [53] Wraight C L, Zangerl A R, Carroll M J, *et al.* Absence of toxicity of *Bacillus thuringiensis* pollen to black swallowtail under field conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 2000, **97**(14): 7700~7703.
- [54] Zangerl A R D, McKenna C L, Wraight M, *et al.* Effects of exposure to event 176 *Bacillus thuringiensis* corn pollen on monarch and black swallowtail caterpillars under field conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 2001, **98**(21):11908~11912.
- [55] Chen S, Wu J Y, Cheng D R, *et al.* On the enzyme-linked immunosorbent assay of *Bacillus thuringiensis* insecticidal protein expressed in transgenic cotton. *Acta Gossypii Sinica*, 1999, **11**(5):259~267.
- [56] Malone L A, Pham-Delègue M-H. Effects of transgene products on honey bees (*Apis mellifera*) and bumblebees (*Bombus* sp.). *Apidologie*, 2001, **32** (4): 287~304.
- [57] Guo S D, Cui H Z. New progress on insect-resistant transgenic cotton research in China. *Scientia Agricultura Sinica*, 1998, **31** (6):1.
- [58] Eady C, Twell D, Lindsey K. Pollen viability and transgene expression following storage in honey. *Transgenic Research*, 1995, **4**: 226~231.

参考文献:

- [3] 喻子牛. 苏云金芽孢杆菌. 北京:科学出版社, 1990. 399~420.
- [4] 莽克强. 转基因植物的生物安全性的商榷. 生物工程进展, 1996, **4**: 2~6.
- [5] 崔洪志, 郭三堆. Bt 毒蛋白抗虫植物基因工程研究. 农业生物技术学报, 1998, **6**(2):166~172.
- [6] 柳武革, 薛庆中. 蛋白酶抑制剂及其在抗虫基因工程中的应用. 生物技术通报, 2000, **1**:20~25.
- [7] 李海燕, 朱延明, 马凤鸣. 植物抗虫基因工程的研究进展. 东北农业大学学报, 2000, **31**(4): 399~405.
- [8] 欧阳石文, 谢丙炎, 赵开军, 等. 转几丁质酶基因研究进展. 生物技术通报, 2001, **3**:28~31.
- [10] 蔡应繁, 叶鹏盛, 张利, 等. β -1,3-葡聚糖酶及其在植物抗真菌病基因工程中的应用. 西南农业学报, 2001, **14**(2): 78~81.
- [11] 梁雪莲, 王引斌, 卫建强, 等. 作物抗除草剂转基因研究进展. 生物技术通报, 2001, **2**:17~21.
- [31] 张复兴. 现代养蜂生产. 北京:中国农业大学出版社, 1998. 330~332.
- [37] 刘标, 薛达元. 生物技术在欧美遇到的抵制及其教训. 农村生态环境, 1998, **14**(4):46~49.
- [45] 崔金杰, 夏敬源. 转 Bt 基因棉对天敌种群动态的影响. 棉花学报, 1999, **11**(2):84~91.
- [55] 陈松, 吴敬音, 程德荣, 等. 抗虫棉 Bt 毒蛋白 ELISA 检测方法的研究. 棉花学报, 1999, **11**(5):259~267.
- [57] 郭三堆, 崔洪志. 中国转基因抗虫棉研究又取得新进展. 中国农业科学, 1998, **31** (6) :1.