

转 Bt 基因玉米的生态安全性研究进展

孙彩霞, 武志杰, 陈利军

(中国科学院沈阳应用生态研究所, 沈阳 110016)

摘要:随着转基因作物的应用和推广, 转 Bt 基因作物释放后对生态环境及其它方面产生的潜在影响越来越受到重视。分别从生物活性杀虫晶体蛋白在土壤中的残留特性、杀虫晶体蛋白对土壤中非目标生物的影响、转 Bt 基因玉米植株体成分的变化、转 Bt 基因玉米花粉中杀虫晶体蛋白的表达特性及其在田间和马力筋叶片上的散积状况、花粉中表达的杀虫晶体蛋白对君主斑蝶的毒性、君主斑蝶幼虫暴露在 Bt 花粉中的概率及综合风险评价估算等方面对转 Bt 基因玉米产生的杀虫晶体蛋白与土壤生态环境的相互作用、花粉对非目标生物影响的研究现状进行了综述。通过对转 Bt 基因作物生态安全性的科学评价和广泛宣传, 以确保生物技术的健康发展。

关键词:转 Bt 基因玉米; Bt 杀虫晶体蛋白(Bt 毒素); 生态安全性

Advances in the eco-safety researches of transgenic Bt maize

SUN Cai-Xia, WU Zhi-Jie, CHEN Li-Jun (*Institute of Applied Ecology, Chinese Academy of Sciences, Shenyang 110016, China*). *Acta Ecologica Sinica*, 2004, 24(4): 798~805.

Abstract: Along with the large-scale release of transgenic crops, their possible ecological risks have been paid an increasing attention. The research on eco-safety of transgenic Bt maize was commented from the following two aspects:

(1) Effect of Bt toxin produced by transgenic Bt maize on soil eco-system Researches on the persistence of purified Bt toxin in soil showed that it could be adsorbed by or bound on soil surface-active particles rapidly, and remained its larvicidal activity. The adsorbed or bound toxin had a higher resistance to degradation than the free one. Other researches with root exudates and crop residues showed that the Bt toxin from transgenic Bt maize tissue bio-degraded faster than the purified toxin, while that in root exudates and from Bt maize biomass remained its larvicidal activity for at least 180 days. The plant component of Bt crops may be varied as a result of exogenous Bt gene transferring. A study showed that Bt maize had a higher lignin content than its isogenic non-Bt maize. Thus, the slower decomposition of the Bt maize biomass may result in a longer persistence of the Bt toxin in soil, and thereby, may enhance its hazard to non-target organisms, and result in the selection and enrichment of toxin-resistant target insects. Till now, there are some researches indicating that the population level and species composition of soil microorganisms were varied after transgenic Bt crops release, but there also have some researches showing that the toxin released from Bt maize roots and biomass appeared to have no deleterious effect on earthworms, nematodes, and microorganisms in soil.

(2) Effect of Bt maize pollen on non-target insects Whether the non-target insects hazard from the Bt toxin expressed in Bt maize pollen is associated with Bt maize pollen (the type, amount and toxicity of its produced protein), feeding plants (their distribution and proportion in cornfield, and the deposition of pollen on them), and non-target insects (their instars, and the susceptibility of their larvae to the Bt protein). Most researches showed that the only transgenic maize pollen that consistently affected monarch larvae was from Cry1Ab event 176 hybrids, but the pollen from Cry1Ab (events Bt11 and Mon 810), Cry1

基金项目:国家自然科学基金资助项目(40101016); 中国科学院沈阳应用生态研究所创新重大资助项目(SCXZD0104-02)

收稿日期:2003-04-27; **修订日期:**2003-08-16

作者简介:孙彩霞(1973~), 女, 黑龙江省人, 博士, 主要从事逆境生理和生态安全性评价方面的研究。E-mail: suncaixia@hotmail.com

Foundation item: the National Natural Science Foundation of China (No. 40101016); the Major Knowledge Innovation Foundation, Shenyang Institute of Applied Ecology (No. SCXZD0104-02)

Received date: 2003-04-27; **Accepted date:** 2003-08-16

Biography: SUN Cai-Xia, Ph. D., Associate professor, mainly engaged in plant physiology in stress environment, eco-safety assessment. E-mail: suncaixia@hotmail.com

F, and experimental Cry 9C hybrids had no acute effects on monarch butterfly larvae in field settings. In comparison with the threats posed to insects by the application of pesticides and other farming practices, the widespread release of Bt maize may have huge benefits for environment, monarch butterfly and other insects survival.

At present, the researches on the effect of Bt maize pollen on non-target insects are turned from describing assessment into quantitative characterization, and the results are acceptable. Due to the complexity and heterogeneity of soil, the effects of Bt protein on it are still not studied profoundly. However, with the advance in recent methodology, especially the introduction of molecular biological techniques, this study will be strengthened further more.

Key words:transgenic Bt maize; Bt insecticidal crystal proteins (Bt toxin); eco-safety

文章编号:1000-0933(2004)04-0798-08 中图分类号:S154.2,Q788 文献标识码:A

转 Bt(*Bacillus thuringiensis*)基因玉米(*Zea mays* L.)是经过遗传修饰能表达杀虫晶体蛋白并杀死取食植株组织的鳞翅目害虫的玉米。从 1990 年美国孟山都公司和迪卡公司用基因枪法获得了能正常结实的转基因抗虫玉米以来,国内外的科学家们开展了将外源 Bt 基因转入玉米的研究工作^[1~6],到 2001 年,转基因玉米的种植面积占全球转基因作物种植面积的 19%,名列第二位^[7]。转 Bt 基因玉米的推广对于减少化学杀虫剂的用量和提高玉米产量起了重要的作用。但是,自从《自然》杂志报道了 Bt 玉米花粉能够危害斑蝶(*Danaus plexippus*)幼虫,Bt 玉米对生态环境不利的潜在影响引起了很多注意^[8~17]。目前,国外的学者们主要围绕转 Bt 基因玉米花粉对非目标生物的影响,Bt 杀虫晶体蛋白与土壤生态环境的相互作用等内容进行了关于转 Bt 基因玉米生态环境安全方面的研究,已经取得了一些结果,而国内在这些方面的研究刚刚起步。本文对于其最新研究进展进行了综述,并提出了今后有关研究中应注意的几个问题,期望促进我国此领域的研究工作。

1 转 Bt 基因玉米的释放对土壤生态系统的影响

土壤是生态系统中物质循环和能量转化过程的重要场所,转 Bt 基因玉米在田间释放的潜在风险之一就是其可通过根系分泌、作物残茬等形式向土壤生态系统中导入毒性物质——Bt 杀虫晶体蛋白(insecticidal crystal protein),又称 Bt 毒素^[18]。杀虫晶体蛋白是苏云金芽孢杆菌在芽孢形成过程中产生的,可分为 α -外毒素、 β -外毒素、 δ -内毒素和 γ -外毒素^[19],而转 Bt 基因植物产生的主要是 δ -内毒素。在菌体内的杀虫蛋白以一种前体的形式存在,称为原毒素(protoxin)并自发形成伴胞晶体,当在昆虫中肠的碱性和还原性环境下被降解为 60Kda 左右的活性肽,并与受体蛋白结合,嵌合于细胞膜,引起膜穿孔,最终导致昆虫瘫痪或死亡^[12,20~24]。但是插入作物体内的修饰基因不是编码合成非毒性的原毒素;而是编码合成活性的杀虫晶体蛋白,因而活化原毒素的高肠道 pH 和专一蛋白酶将不是其产生毒性的必需因素了,这将加剧其对非目标生物体的潜在风险。如果导入土壤中的蛋白被结合到土壤环境中的其它颗粒(例如:土壤矿物质)而不易被微生物降解并仍然保持杀虫晶体蛋白活性,将导致杀虫晶体蛋白的累积,从而可能造成对土壤微生物区系,有益昆虫(例如:传粉昆虫、捕食动物、害虫的寄生虫)和其它动物类等非目标生物体的持续危害^[25~28]。

1.1 生物活性杀虫晶体蛋白在土壤中的残留特性

转 Bt 基因作物释放后导入土壤中杀虫晶体蛋白的生物活性是评价其环境命运和对非目标物种潜在风险的最重要参数。因而,学者们对杀虫晶体蛋白在土壤中的残余量及毒性进行了大量的试验并取得了一些结果。

1.1.1 纯化杀虫晶体蛋白的土壤残留特性 国外的学者们首先在试验室内进行了纯化杀虫晶体蛋白与土壤性质的关系研究。Venkateswerlu 等研究表明,Btk 杀虫晶体蛋白(由 Bt 亚种 *kurstaki* 产生)和 Btt 杀虫晶体蛋白(由 Bt 亚种 *tenebrionis* 产生)能快速被土壤吸附并紧紧地结合,吸附在 30min 内达到动态平衡,但结合蛋白的结构并未被修饰^[29]。Tapp 等研究表明,添加到土壤中的杀虫晶体蛋白能与土壤微粒结合,在非灭菌条件下 40d 后,用点印迹酶联免疫法检测到其具有杀虫活性^[30,31]。Crecchio 等根据 Btk 纯化杀虫晶体蛋白与 4 种不同土壤中纯化的腐殖酸结合的研究,确定了土壤腐殖酸和土壤活性杀虫晶体蛋白的存在有关^[32]。结合态杀虫晶体蛋白仍保持杀虫活性,且与腐殖酸结合后的杀虫晶体蛋白比游离态杀虫晶体蛋白更抗降解。Crecchio 和 Stozky 研究结果表明,在第 1 小时内,Btk 活性杀虫晶体蛋白与蒙脱石-腐殖酸-Al 羟基聚合体混合物的吸附达到总吸附量的 70%,在 8h 内产生了最大吸附^[33]。Tapp 等的研究表明,当纯化的 Btk 杀虫晶体蛋白加入到非灭菌土壤中经过 234d,对于烟草天蛾幼虫仍具有杀虫活性^[34]。采用最优的提取过程的研究表明,纯化 Bt 蛋白从土壤中的回收率为 27%~47%^[35]。

1.1.2 转 Bt 基因玉米组织中杀虫晶体蛋白的土壤残留特性 转 Bt 基因玉米释放后,向土壤中输入杀虫晶体蛋白的主要方式之一是作物残茬,因而学者们通过将转 Bt 基因玉米组织添加到土壤中的研究以揭示植株体内杀虫晶体蛋白在土壤中的残留特性。Sims 等研究表明,随加入 Bt 玉米组织土壤样品培养时间的延长,EC₅₀值相应的逐渐增加,这表明转 Bt 基因玉米组织材料中的杀虫晶体蛋白的生物活性由于暴露在土壤中而快速下降。而当植物组织与土壤分离后,杀虫晶体蛋白衰变的相当慢^[36],这可能是由于植物材料腐烂时释放出降解性酶和化合物(直接来源于植物或者是来源于植物相关微生物);植物材料中的杀虫晶体

蛋白比纯化杀虫晶体蛋白易于受土壤中降解性微生物影响,或者由于植物材料的添加增加了土壤微生物的种群^[39]。Palm 等的研究表明,由于生物降解或与土壤颗粒的缓慢结合和吸附,转 Bt 棉花组织加入土壤的 7d 内,土壤中可提取的杀虫晶体蛋白浓度快速下降,之后下降的速度比较稳定,甚至维持数周不变^[37]。另外,Sims 等估算作为玉米组织的构成成分导入土壤中的最高杀虫晶体蛋白总量不会超过 0.813kg/hm²(653g 干重/株×98,817 株/hm²)。如果将含有杀虫晶体蛋白的玉米植株组织均一的加入到 15.24cm 深的上层土壤中,杀虫晶体蛋白最大的“田间负载”为 0.533μg/cm³ 或 0.533mg/kg^[36]。

1.1.3 转 Bt 基因玉米根系分泌物中杀虫晶体蛋白的土壤残留特性 Saxena 等^[40]将玉米幼苗根际土壤用缓冲液提取并旋转离心,然后用免疫法和杀虫性检测分析上清液,发现转 Bt 基因玉米生长 25 d 后其根圈中分泌的杀虫晶体蛋白具有杀虫毒性。用根际土壤的悬浮颗粒直接进行生物检测,具有与上清液相当的杀死率。这些结果与早期的关于纯化杀虫晶体蛋白快速与土壤活性表面颗粒结合并保持杀虫毒性且免于生物降解的研究结果是一致的。大田生长的 Bt 玉米植株的根际土壤在整个生长季和其收获后的几个月以及随后的霜冻期间也存在杀虫晶体蛋白^[41],即使对土壤进行 40 d 冻融和干湿交替处理也如此。Bt 玉米根系分泌物和生物体释放的杀虫晶体蛋白至少保持 180 d 杀虫活性^[42]。

值得注意的是早期关于 DT₅₀(半减期)的报道变化很大,从 2.7d 到 100d 不等,而且土壤中 Bt 产生的晶体蛋白呈非指数衰减^[38,43]。因为没有可靠的衰减速率常数或半减期,将杀虫晶体蛋白残留特性数量化是比较困难的。目前通过试验仅提供关于 Bt 杀虫晶体蛋白在土壤中衰减和残留的定性预测而并非是通用的量化数值。土壤是复杂的基质,许多因子可以影响土壤中蛋白的降解。土壤中杀虫晶体蛋白的降解速率不仅与杀虫晶体蛋白的类型、形式(孢子或晶体)、浓度有关,而且与土壤类型、土壤湿度、土壤微生物的构成、耕作的深度和气候等因子有关^[44~47]。

1.2 杀虫晶体蛋白对土壤中非目标生物的影响

土壤微生物是风险评价的重点、原生动动物是监测土壤生物种群变化的最敏感指标之一^[48]。Donegan 等^[39]研究发现美国的几种转 Bt 基因棉花释放后土壤中的微生物数量、种类和组成与常规棉差异显著,Watrud 和 Seidier^[49]也报道了转 Bt 基因棉花的释放提高了土壤中细菌和真菌的数量。但是也有研究结果表明,游离或结合态杀虫晶体蛋白对细菌、真菌、藻类的生长通常没有影响^[39,50]。Saxena 和 Stotzky 研究结果表明,转 Bt 基因玉米根系分泌物和植物体中释放的杀虫晶体蛋白对土壤中的蚯蚓、线虫、原生动动物、细菌和真菌没有毒性^[42]。这些仅仅是初步研究结果,关于生物体组群的多样性和构成的详细情况仍需更多研究。

1.3 转 Bt 基因玉米植株体成分的变化与土壤微生态的关系

杀虫晶体蛋白可以通过转 Bt 基因玉米的根茬、生长凋落物等导入到土壤中。因而有必要研究转 Bt 基因玉米植株体的化学成分及其残余物的降解是否发生了变化。Saxena 和 Stotzky 用荧光显微镜法和甲苯胺蓝斑点试验表明在所有 10 个 Bt 玉米杂交种(代表了 3 种不同的转换事件)中的维管束鞘和维管束鞘周围的厚壁细胞内的木质素含量高于其各自的非 Bt 基因等位系(isolines)玉米。化学分析结果进一步表明,无论是将转 Bt 基因玉米种植在生长室内还是在大田中,所有 Bt 玉米杂交种的木质素含量比其各自的非 Bt 基因等位系玉米高 33%~97%^[51]。如果木质素含量增加,将能增强对二代欧洲玉米钻心虫的抗性^[52],减少对霉菌的感染性^[53],阻碍微生物对枯枝落叶的降解和分解^[54~55],而且可能影响食草动物的种群动态和给食速率^[56~58]。

Stotzky^[59]等研究表明,向土壤中添加 Bt 玉米植株体导致土壤总的新陈代谢活性(例如,CO₂ 的放出)明显低于添加非 Bt 玉米植株体的处理,这一变化可能使 Bt 玉米组织在土壤中以高水平积累并存在很长时间,从而可以改善土壤的结构并减少冲刷,也可能由于 Bt 玉米组织的长期存在而延迟杀虫晶体蛋白在土壤中残留时间进而加强对非目标生物的危害并导致目标昆虫毒素抗性的选择和富集^[60~62]。

2 转 Bt 基因玉米花粉对非目标昆虫的影响

在美国北部和加拿大南部君主斑蝶的主要寄主植物马力筋(*Asclepias curassavica*)通常生长在玉米田内及其附近,而该地区玉米散粉期在 6 月末和 8 月中旬之间,正是斑蝶幼虫取食的阶段^[40,63~65]。黑凤蝶(*Papilio polyxenes*)几乎完全取食于伞形类植物(*Apiaceous*),其中的几种可以在牧场、路边、作物种植区边界,空地等与斑蝶寄主相同的生境中找到^[66]。可见,君主斑蝶和黑凤蝶是可能暴露在转 Bt 基因玉米花粉中的主要非目标昆虫。但是转 Bt 基因玉米花粉是否影响君主斑蝶等非目标昆虫和寄主植物马力筋及毒性物质源转 Bt 基因玉米相关,国外的学者们以转 Bt 基因玉米、马力筋、君主斑蝶三者为研究要素开展了研究工作。

2.1 转 Bt 基因玉米花粉中杀虫晶体蛋白的表达特性及其在田间和马力筋叶片上的散积状况

不同转基因事件的玉米杂交种花粉中杀虫晶体蛋白的表达类型、表达部位和表达量有所不同。目前普遍或已经商业化应用的 Bt 玉米杂交种的基因类型有 Cry1Ab (Bt11, Mon810, 176), Cry9C (Cbh351), 或 Cry1Ac (Ddt418)以及美国环保署注册最近申请发放的 Cry1F 基因(Tc1507)。其中,176 含有一个玉米特效花粉启动子和一个玉米磷酸烯醇丙酮酸羧化酶启动子^[5]; Tc1507 杂交种含有泛素(ubiquitin)启动子,其它商业 Bt 杂交种含有花椰菜嵌嵌病毒 35S 启动子^[67]。Stanley-Horn 等^[68]研究结果表明,不同转基因事件玉米花粉中的杀虫晶体蛋白的表达量不同,因而其杀虫性也有所不同。其中,176 表达杀虫晶体蛋白

白的最高含量超过 7.1 $\mu\text{g/g}$ 花粉;Bt11、Mon810 表达的杀虫晶体蛋白量 $<0.09 \mu\text{g/g}$ 花粉。Wraight 等^[69]测定结果表明 176 花粉表达的蛋白量($90.5 \pm 2.6 \text{ ng/g}$)是 810 花粉表达蛋白量($2.1 \pm 0.3 \text{ ng/g}$)的 40 多倍。

Bt 玉米花粉表达的杀虫晶体蛋白是否对非目标昆虫有毒害作用与花粉在田间及马力筋叶片上的散积状况有关。首先,环境条件如风向、降雨对玉米花粉在田间的散积状况有很大影响。其中降雨能将花粉从叶片上冲刷掉,是影响田间花粉密度的重要环境因子。环境因子还可以通过影响花粉释放的时间,释放的总量来影响花粉密度。其次,马力筋植株在玉米冠层内的位置;马力筋叶片性状,如叶毛、叶片大小、叶角度、叶向值;马力筋叶片在植株上的着生位置等均能影响马力筋叶片上花粉密度。第三,不同转基因事件玉米杂交种可因其花粉产生总量的不同而影响田间及马力筋叶片上的花粉密度。Pleasants 等^[70]在不同地点的数个试验中测定了玉米田内和玉米田外的马力筋属植物叶片上的玉米花粉密度。在玉米田内花粉密度是最高的(平均 170.6 粒/cm^2)向玉米地边缘逐渐减低,在 2m 处降至 14.2 粒/cm^2 。在玉米田内,95% 的叶片样本的花粉密度低于 600 粒/cm^2 ,最高的花粉密度为 1400 粒/cm^2 ,该数据是在开花期没有降雨的情况下获得的。实际上,在玉米田内超过 1000 粒/cm^2 的密度并不普遍,在开花期内仅有不到 1% 的马力筋叶片上的花粉密度达到了此浓度。从花粉的生物检测的结果来看,花粉密度超过 1000 粒/cm^2 时才可能导致对幼虫生长发育有明显不利影响。

2.2 杀虫晶体蛋白对君主斑蝶的毒性

不同类型的杀虫晶体蛋白的非目标毒性不同^[71]。纯化的 Cry1Ab 和 Cry1Ac 杀虫晶体蛋白对一龄君主斑蝶幼虫在致命性和生长抑制作用方面均具有毒性,但是 Cry9C 和 Cry1F 杀虫晶体蛋白则相对无毒性。尤其是 Cry1F 杀虫晶体蛋白,虽然在高浓度下有生长抑制作用但在所测试的任何浓度下均无致命性。现有结果表明,甚至在低水平下,始终影响斑蝶幼虫的转基因玉米花粉是源于 Cry1Ab 的 176 杂交种,来源于 Cry1Ab 基因 (Bt 11、Mon810) 和 Cry1F 基因以及试验性的 Cry9C 基因杂交种的花粉,在田间试验中对斑蝶没有敏锐的影响。Stanley-Horn 等^[68]的研究结果表明,暴露在 176 低剂量花粉(大约 22 粒/cm^2)密度下的 1 龄虫的体重在 5d 内比 Bt11 或 Mon810 下降 18%,当 176 花粉密度为 67 粒/cm^2 时,1 龄虫的存活和生长受到显著影响。相对而言,Bt11 花粉剂量分别为 55 和 97 粒/cm^2 时对成虫的生长或 1 龄、3 龄虫的存活没有直接不利影响。在花粉密度超过 1000 粒/cm^2 时,Bt11 可能对幼虫体重的增加有较小影响^[71]。

不同虫龄的斑蝶幼虫对杀虫晶体蛋白的感受性不同^[72]。Oberhauser 等^[73]在分别代表美国东北部斑蝶繁殖区的 4 个不同类型生境调查的幼虫存活率表明,在所有地区和生境中,早龄幼虫的死亡率高,随虫龄的增加死亡率下降。Hellmich 等^[71]以 Cry1Ab 杀虫晶体蛋白处理不同虫龄的斑蝶幼虫的研究结果表明 2~3 龄虫和 3~4 龄虫对 Cry1Ab 杀虫晶体蛋白的耐性比 1 龄虫分别强 12 和 23 倍。然而,尚不确定早期幼虫生长的延迟是否影响其长期生长发育或繁殖适度。另外,马力筋上部叶片花粉密度为叶片中部的 30%~50%,下部叶片的花粉密度是中部叶片的 50%~100%^[70],君主斑蝶幼虫非常不耐杀虫晶体蛋白,它们基本趋向取食上部叶片。可见对花粉的偏爱或逃避影响幼虫对花粉杀虫晶体蛋白的感受性。

2.3 君主斑蝶幼虫暴露在 Bt 花粉中的概率及综合风险评价估算

Oberhauser^[73]等指出斑蝶幼虫是否暴露在转 Bt 基因玉米花粉中取决于斑蝶种群和玉米开花期的生物气候学交迭以及斑蝶取食的马力筋和玉米田在时间和空间上的交迭程度。为定量描述斑蝶幼虫暴露在 Bt 基因玉米花粉中的概率,Sears 等^[14]综合已有研究结果并提出估算方程 $Pe=l \times o \times a$ 。其中, Pe 为暴露概率; l 为来源于玉米田斑蝶的比例; o 为扬花期与幼虫易感时期的交迭; a 为转 Bt 基因玉米的种植率。以 Oberhauser 等^[73]在衣阿华州的试验结果为例:已知有 56% 斑蝶源于玉米地,其中的 15% 能暴露在花粉中,其中 35% 的花粉是 Bt 玉米花粉,则暴露在 Bt 玉米花粉的概率约为 3%。

Sears 等^[14]提出根据方程 $R=Pe \times Pt$ 进行综合风险估算。其中, R 为综合风险; Pe 为暴露概率; Pt 为暴露在有效花粉浓度的斑蝶种群的比例。Sears 等根据已有花粉密度的测定结果推算出,176 玉米田内花粉密度超过最低有效花粉浓度(10 粒/cm^2)的比例为 90%,而 Bt11 和 Mon810 玉米田内超过最低有效花粉浓度(1000 粒/cm^2)的比例约为 0.7%。如果 176 的种植面积为 5%,Bt11 和 Mon810 的种植面积为 20%,则其综合风险估算值分别为 0.38% 和 0.047%。

2.4 Bt 玉米花粉对黑凤蝶及其它非目标昆虫影响的研究

Wraight 等^[69]将盆栽寄主植物接种一龄黑凤蝶,在开花始期,以一定间隔置于 Bt 玉米田边。研究结果表明,距离田地近或寄主植物沉积花粉水平与黑色斑蝶死亡率间没有关系。而且,在试验室内,最高剂量($10,000 \text{ 粒/cm}^2$)的 Mon810 花粉浓度对黑凤蝶 1 龄虫的存活率没有影响。这一剂量远远超过在玉米田内观测到的花粉密度(200 粒/cm^2)。他们推断 Bt 花粉未必影响野生黑凤蝶种群,至少转基因植物的利用对某些非目标生物的潜在影响是可以容易控制的。随后,Zangerl 等^[17]以杀虫晶体蛋白含量表达较高的 176 玉米花粉为试验材料的研究表明,在 100 粒/cm^2 的花粉浓度下,黑凤蝶的存活率有明显的下降。生物检测的结果表明 LC_{50} (半致死剂量)为 613 粒/cm^2 。

另外,田间试验结果也表明,转 Bt 基因玉米对蚜虫、小地老虎、玉米切根虫、金针虫、蛱蝶和瓜种蝇等害虫无毒性,对取食花粉的捕食性天敌如十二星瓢虫和小暗色花蝽的生长发育及捕食能力无显著影响^[74~76]。

2.5 转 Bt 基因玉米花粉与其它风险的对比

评价转 Bt 基因玉米花粉对非目标昆虫的潜在风险,对比其它农事操作对其产生的不利影响是非常重要的。从 1996 年到 1999 年,导致墨西哥境内越冬的斑蝶种群大量下降的主要因素是墨西哥生境的毁坏以及美、墨两国杀虫剂的大面积使用。在美国,农业杀虫剂的施用导致的公众健康和环境损害是非常严重的。其中杀虫剂的施用严重影响了生物多样性,每年大约有 7 千万的鸟以及数以亿计的有益或有害昆虫被杀死^[77]。Stanley-Horn 等^[68]研究表明,非 Bt 基因玉米喷施杀虫剂(λ -cyhalothrin)对斑蝶的存活和生长有不利影响。

在美国,欧洲玉米钻心虫使玉米减产达 20%,为了获得高产,玉米田使用杀虫剂多于其它作物^[33]。而 Bt 玉米杂交种的大面积推广明显的减少了杀虫剂的使用而使环境受益,对斑蝶种群和其它昆虫的存活应该是非常有利的^[78~80]。现在转基因玉米、棉花和大豆已经进入商业化使用超过 5a 了,种植了数百万公顷没有任何不利于生态环境的大田报道^[74,76,81]。另外,在农田生境中影响马力筋密度的其它农事操作,如耕作、除草剂的使用、作物选择等可以影响马力筋的个体密度进而影响玉米田内斑蝶种群的数量^[82~83]。

3 展望

转基因作物释放后对生态环境影响的研究,对于进行转基因作物生态安全性评价、确保生物技术健康发展具有重要意义。如上所述,关于杀虫晶体蛋白与土壤微生态的相互作用、花粉对非目标生物影响的研究已经取得了一些结果,然而在研究中仍需注意的是:

(1)转 Bt 基因玉米产生的杀虫晶体蛋白对非目标生物的影响需要科学评价和广泛宣传,不能片面强调其可能对非目标生物的危害。否则,比较小的风险却可能被公众明显的扩大,从而可能阻碍生物技术的正常发展。

(2)研究者在进行转 Bt 基因玉米花粉的非目标毒性的研究过程中发现在玉米开花期内马力筋叶片上经常有花药,而花药等组织表达的杀虫晶体蛋白量远远高于花粉。因而斑蝶幼虫是否取食明显比花粉颗粒大且毒性强的花药,从而进一步产生非目标毒害的相关研究需要开展。降雨等环境条件能够减少玉米田内马力筋叶片上的花粉量,但是沉积到土壤和水体等环境中的花粉数量及毒性是否产生后续反应等,则需要针对不同环境条件下不同时效花粉内杀虫晶体蛋白的自然降解特性进行研究。

(3)目前转 Bt 基因玉米通过根系分泌物及作物残茬对土壤生态系统的影响成为转基因作物生态安全性研究的又一热点。根际是植物、土壤和微生物密切相关的一个区域。因而转基因作物释放后,杀虫晶体蛋白进入土壤后,根际土壤特性发生了何种变化需进行大量研究,要确定杀虫晶体蛋白与根际土壤理化性质(如:pH,CEC,机械组成,腐殖质组分及总酸度),土壤生物活性(如:土壤中与营养物质转化密切相关的酶活性变化),土壤不同种类微生物种群数量的关系。而且,在进行该问题研究时,研究者应该借引国外学者关于转 Bt 基因玉米花粉对斑蝶非目标影响的研究过程,以合理的调查方法和正确的风险评价程序为基础,室内试验和田间试验的研究结果相结合,最后将描述性的潜在风险评价进行量化表征。

References:

- [1] Alstad D N, Andow D A. Managing the evolution of insect resistance to transgenic plants. *Sci.*, 1995, **268**:1894~1896.
- [2] Ding Q X, Li Y T, Dai J R, *et al.* Studies on the transfer of Bt crystal protein gene into maize by pollen tube injecting pathway. *Chin. Sci. B*, 1993, **23**(7):707~713.
- [3] Fromm M E, Morrish F, Armstrong C, *et al.* Inheritance and expression of chimerical genes in the progeny of transgenic maize plants. *Bio-Tech.*, 1990, **8**(9):833~839.
- [4] Gordon-Kamm W J, Spencer T M, Mangano M L, *et al.* Transformation of maize cells and regeneration of fertile transgenic plants. *Plant Cell*, 1990, **2**(7):603~618.
- [5] Koziel M G, Carozzi N B, Currier T C, *et al.* The insecticidal crystal protein of *Bacillus thuringiensis*: past, present and future uses. *Biotech. Genet Engin. Rev.*, 1993, **11**:171~178.
- [6] Wang G Y, Zhang H. Studies on three maize gene transfer techniques. *Chin. J. Biotech.*, 1996, **12**(1):45~49.
- [7] Pan W L, Chen J H, Luo D, *et al.* Quantitative detection of genetically modified Bt 176 maize in maize powder. *Plant Physiol. and Mol. Biol.*, 2002, **28**(6):463~467.
- [8] Barton J E and Miles D. Genetically Modified Crops and the Environment. *Agron. J.*, 2000, **92**(4):797~803.
- [9] Goldberg R J, Tjaden H. Are *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* plant really safe to eat? *Bio-Tech.*, 1990, **8**(11):1011~1015.
- [10] Johnson K S, Scriber J M, Nitas J K, *et al.* Toxicity of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* to three non-target lepidopteran in field studies. *Environ. Entomol.*, 1995, **24**(1):288~297.
- [11] Losey J R, L S, Cater M E. Transgenic pollen harms monarch larvae. *Nature*, 1999, **399**:214.
- [12] Liu Q, Zhu X Q ed. *Bio-safety*. Beijing: Science Press, 2001.

- [13] Pimentel D S, Raven P H. Bt corn pollen impacts on non-target Lepidoptera: Assessment of effects in nature *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2000, **97**(15):8198~8199.
- [14] Sears M K, Hellmich R L, Diane E. Impact of Bt corn pollen on monarch butterfly populations: A risk assessment. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2001, **98**(21): 11937~11942.
- [15] Vaeck M, Reynanerts A, Hofte H, *et al.* Transgenic plants protected from insect attack. *Nature*, 1987, **328**(6125):33~37.
- [16] Warnock D F, Hutchison W D, Cindy B S. Evaluating maize for allelochemicals that affect European corn borer (Lepidoptera: Crambidae) larval development. *Crop Sci.*, 2001, **41**(16):1761~1771.
- [17] Zangerl A R, McKenna D, Wraight C L, *et al.* Effects of exposure to event 176 *Bacillus thuringiensis* corn pollen on monarch and black swallowtail caterpillars under field conditions. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2001, **98**(21):11908~11912.
- [18] Morra M J. Assessing the impact of transgenic plant products on soil organisms. *Mol. Ecol.*, 1994, **3**(1):53~55.
- [19] Heimpel A M. A critical review of *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* Berliner and other crystalliferous bacteria. *Annu. Rev. Entomol.*, 1967, **12**(11):287~322.
- [20] Barton K A, Whiteley H R, Yang N S. *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin expressed in transgenic *Nicotiana tabacum* provides resistance to lepidopteran insects. *Plant Physiol.*, 1987, **85**(4):1103~1109.
- [21] Cummings C E, Armstrong G, Hodgman TC, *et al.* Structural and functional studies of a synthetic peptide mimicking a proposed membrane inserting region of a *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin. *Mol. Memb. Biol.*, 1994, **11**(2):87~92.
- [22] Ferre J, Escriche B, Bel Y, *et al.* Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal protein. *FEMS Microbiol. Letters*, 1995, **132**(1):1~7.
- [23] Hofte H and Whiteley H R. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol. Rev.*, 1989, **53**(2):241~255.
- [24] Van R J, McGaughey W H, Jonhson D E, *et al.* Mechanism of insect resistance to the microbial insecticide of *Bacillus thuringiensis*. *Sci.*, 1990, **247**:72~74.
- [25] Heckel D G. The complex genetic basis of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin in insects. *Biocontrol. Sci. & Techn.*, 1994, **4**(4):405~417.
- [26] Koskella J, Stotzky G. Microbial utilization of free and clay-bound insecticidal toxins from and their retention of insecticidal activity after incubation with microbes. *Appl. and Environ. Micro.*, 1997, **63**(9):3561~3568.
- [27] McGaughey W H and Whalon M E. Managing insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin. *Sci.*, 1992, **258**:1451~1455.
- [28] Sims S R, Ream J E. Soil inactivation of the insecticidal protein within transgenic cotton tissue: laboratory microcosms and field studies. *J. Agric. and Food Chem.*, 1997, **45**(4):1502~1505.
- [29] Venkateswerlu G and Stotzky G. Banding of the protoxin and toxin proteins from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* on clay minerals. *Current Microbiol.*, 1992, **25**(4):225~233.
- [30] Tapp H and Stotzky G. Dot blot enzyme-linked immunosorbent assay for monitoring the fate of insecticidal toxins from *Bacillus thuringiensis* in soil. *Appl. and Environ. Microbiol.*, 1995, **61**(2):602~609.
- [31] Tapp H and Stotzky G. Insecticidal activity of the toxins from *Bacillus thuringiensis* subspecies *kurstaki* and *tenebrionis* adsorbed and bound on pure and soil clays. *Appl. and Environ. Microbiol.*, 1995, **61**(5):1786~1790.
- [32] Crecchio C and Stotzky G. Insecticidal activity and biodegradation of the toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* bound to humic acids from soil. *Soil Biol. Biochem.*, 1998, **30**(4):463~470.
- [33] Crecchio C and Stotzky G. Biodegradation and insecticidal activity of the toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* bound to complexes of montmorillonite-humic acids-Al hydroxypolymers. *Soil Biol. Biochem.*, 2001, **33**(5):573~581.
- [34] Tapp H and Stotzky G. Persistence of the insecticidal toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *Kurstaki* in soil. *Soil Biol. Biochem.*, 1998, **30**(4):471~476.
- [35] Palm C J, Donegan K K, Harris D L, *et al.* Quantitation in soil of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* delta-endotoxin from transgenic plants. *Mol. Ecol.*, 1994, **3**(2):145~151.
- [36] Sims S R, Holden L R. Insect bioassay for determining soil degradation of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* Cry1A (b) protein in corn tissues. *Environ. Entomol.*, 1996, **25**(3):659~664.
- [37] Palm C J, Schaller D L, Donegan K K, *et al.* Persistence in soil of transgenic plant produced *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* δ -endotoxin. *Can. J. Microbiol.*, 1996, **42**(12):1258~1262.
- [38] West A W. Fate of the insecticidal, proteinaceous parasporal crystal of *Bacillus thuringiensis* in soil. *Soil Biol. Biochem.*, 1984, **16**(4): 357~364.
- [39] Donegan K K, Palm C J, Fieland V J, *et al.* Changes in levels, species, and DNA fingerprints of soil microorganisms associated with

- cotton expressing *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* the endotoxin. *Appl. Soil Ecol.*, 1995, **2**(2):111~124.
- [40] Saxena D, Flores S, Stotzky G. Insecticidal toxin in root exudates from Bt corn. *Nature*, 1999, **402**:480.
- [41] Saxena D, Stotzky G. Insecticidal toxin from *Bacillus thuringiensis* is released from roots of transgenic Bt corn in vitro and in situ. *FEMS Micro. Ecol.*, 2000, **33**(1):35~39.
- [42] Saxena D, Stotzky G. *Bacillus thuringiensis* toxin released from root exudates and biomass of Bt corn has no apparent effect on earthworms, nematodes, protozoa, bacteria, and fungi in soil. *Soil Bio. Biochem.*, 2001, **33**(9):1225~1230.
- [43] Pruett C J, Burges H D, and Wyborn C H. Effect of exposure to soil on potency and spore viability of *Bacillus thuringiensis*. *J. Invertebr. Pathol.*, 1980, **35**(2):168~174.
- [44] Pozsgay M, Fast P, Kaplam H, *et al.* The effect of sunlight on the protein crystals from *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* HD1 and NRD12: a raman spectroscopic study. *J. Invertebr. Pathol.*, 1987, **50**(3):246~253.
- [45] Pusztal M P, Fast P, Gringorten L, *et al.* The mechanism of sunlight-mediated inactivation of *Bacillus thuringiensis* crystals. *Biochem.*, 1991, **273**(1):43~47.
- [46] Wang W J, Qian C F, Shen J Z, *et al.* The inactivation of *Bacillus thuringiensis* parasporal crystals by ultraviolet action in humic acids. *Acta. Phytophylacica Sinica*, 2001, **28**(1): 49~54.
- [47] West A W, Burges H D, Dixon T J, *et al.* Survival of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus* spore inocula in soil: effect of pH, moisture, nutrient availability and indigenous microorganisms. *Soil Biol. Biochem.*, 1985, **17**(5):657~666.
- [48] Angle J S. Release of transgenic plants: Biodiversity and population level considerations. *Mol. Ecol.*, 1994, **3**(1):45~50.
- [49] Watrud L S, Seidler R J. Non-target ecological effects of plants, microbial, and chemical introduction to terrestrial systems. *Soil Chemistry and Ecosystem Health*. Soil Science Society of America, Madison, Wisconsin, 1998. 313~340.
- [50] Donegan K K, Schaller D L, Stone J K, *et al.* Microbial populations, fungal species diversity and plant pathogen levels in field plots of potato plants expressing the *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis* endotoxin. *Trans. Res.*, 1996, **5**(1):25~35.
- [51] Saxena D and Stotzky G. Bt corn has a higher lignin content than non-Bt corn. *Amer. J. Bot.*, 2001, **88**(9):1704~1706.
- [52] Ostrander B N, Coors J G. Relationship between plant composition and European corn borer resistance in three maize populations. *Crop Sci.*, 1997, **37**(6): 1741~1741.
- [53] Masoero F, Moschini M, Rossi F, *et al.* Nutritive value, mycotoxin contamination and *in vitro* rumen fermentation of normal and genetically modified corn (Cry1A(B)) grown in northern Italy. *Maydica*, 1999, **44**(3): 205~205.
- [54] Reddy C A. Physiology and biochemistry of lignin degradation. In: M. J. Klug and C. A. Reddy eds., *Current perspectives in microbial ecology: proceedings of the Third International Symposium on Microbial Ecology*. American Society for Microbiology, Washington, D. C., USA, 1984. 558~571.
- [55] Tovar-Gomez M R, Emile J C, Michalet-Doreau B, *et al.* *In situ* degradation kinetics of maize hybrid stalks. *Anim. Feed Sci. and Tech.*, 1997, **68**(1~2): 77~77.
- [56] Barriere Y, Argillier O. Brown-midrib genes of maize: a review. *Agro.*, 1993, **13**(8): 865~865.
- [57] Jung H G and Allen M S. Characteristics of plant-cell walls affecting intake and digestibility of forages by ruminants. *J. Anim. Sci.*, 1995, **73**(11): 2774~2774.
- [58] Gardner P T, Wood T J, Chesson A, *et al.* Effect of degradation on the porosity and surface area of forage cell walls of differing lignin content. *J. Sci. of Food and Agric.*, 1999, **79**(1): 11~17.
- [59] Stotzky G. Persistence and biological activity in soil of insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis* and of bacterial DNA bound on clays and humic acids. *J. Environ. Quality*, 2000, **29**(4): 691~691.
- [60] James R R, Difazio S P, Brunner A M, *et al.* Environmental effects of genetically engineered woody biomass crops. *Biomass and Bioenergy*, 1998, **14**(4): 403~403.
- [61] Fusi P, Ristori G, Calamai L, *et al.* Adsorption and binding of protein on “clean”(homoionic) and “dirty”(coated with Fe hydroxides) montmorillonite, illite and kaolinite. *Soil Bio. Biochem.*, 1989, **21**(7):911~920.
- [62] Tapp H, Calamai and Stotzky G. Adsorption and binding of the insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* and subsp. *tenebrionis* on clay. *Soil Biol. Biochem.*, 1994, **25**(6):663~679.
- [63] Hartzler R G, and Buhler D D. Occurrence of common milkweed (*Asclepias syriaca*) in cropland and adjacent areas. *Crop Protection*, 2000, **19**(5):363~366.
- [64] Malcolm S B, Cockrell B J and Brower L P. In: Malcolm, S. B. & Zalucki, M. P. eds. *Biology and Conservation of the Monarch Butterfly*. Mus. Los Angeles County, 1993. 253~267.
- [65] Wassenaar L I and Hobson K A. Natal origins of migratory monarch butterflies at wintering colonies in Mexico: New isotopic evidence.

Proc. Natl. Acad. Sci., 1998, **95**(26): 15436~15439.

- [66] University of Illinois at Urban Champaign. Weeds of the North Central States, North Central Regional Pub. No. 36, Circular 718(Univ. of Illinois agricultural experiment station, urbana),1979.
- [67] Christensen A H, Sharrock R A, Quail P H. Maize polyubiquitin genes: structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing, and promoter activity following transfer to protoplasts by electroporation. *Plant Mol. Biol.*, 1992,**18**(4): 675~689.
- [68] Stanley-Horn D E, Dively G P, Hellmich R L, *et al.* Assessing the impact of Cry1Ab-expressing corn pollen on monarch butterfly larvae in field studies. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2001, **98**(21):11931~11936.
- [69] Wraight C L, Zangerl A R, Carroll M J, *et al.* Absence of toxicity of *Bacillus thuringiensis* pollen to black swallowtails under field conditions. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2000, **97**(14): 7700~7703.
- [70] Pleasants J M, Hellmich R L, Dively G P, *et al.* Corn pollen deposition on milkweeds in and near cornfields. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2001, **98**(21): 11919~11924.
- [71] Hellmich R L, Siegfried B D, Sears M K, *et al.* Monarch larvae sensitivity to *Bacillus thuringiensis*- purified proteins and pollen. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2001, **98**(21):11925~11930.
- [72] Jesse L G and Obrycki J J. Body size and food web structure: testing the equiprobability assumption of the cascade model. *Oecologia*, 1999,**123**(5):241~248.
- [73] Oberhauser K S, Prysby M D, Mattila H R, *et al.* Temporal and spatial overlap between monarch larvae and corn pollen. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2001, **98**(21):11913~11918.
- [74] Lozzia G C. Biodiversity and structure of ground beetle assemblages (*Coleoptera carabidae*) in Bt corn and its effects on non-target insects. *Boll Zool Agrar Bachicoltura*, 1999,**31**(1): 37~58.
- [75] Orr D B, Landis D A. Oviposition of European corn borer (*Lepidoptera Pyralidae*) and impact of natural enemy population in transgenic versus isogenic corn. *J. Econ. Entomol.*, 1997, **90**(2): 905~909.
- [76] Pilcher C D, Rice M E, Obrycki J J, *et al.* Field and laboratory evaluations of transgenic *Bacillus thuringiensis* corn on secondary lepidopteran pests (Lepidopteran; Noctuidae). *J. Econ. Entomol.*, 1997, **90**(2): 669~678.
- [77] Pimentel D, Acquay H, Biltonen M, *et al.* Assessment of environmental and economic costs of pesticide use. In: Pimentel, D. & Lehman, H. eds. *The Pesticide Question: Environment, Economics and Ethics*. Chapman & Hall, New York, 1993. 47~48.
- [78] Gianessi, L P and Carpenter J E. *Agricultural Biotechnology: Updated Benefit Estimates*. National Center for Food and Agricultural Policy, Washington, DC, 2001.
- [79] Pimentel D, McLaughlin L, Zepp A, *et al.* Environmental and economic-effects of reducing pesticide use in agriculture. *Agric. Ecosyst. Environ.*, 1993, **46**(1~4):273~288.
- [80] Trewavas A and Leaver C. Is opposition to GM crops science or politics? An investigation into the arguments that GM crops pose a particular threat to the environment. *EMBO Reports*, 2001, **2**(6): 455~459.
- [81] Xia J Y, Cui-Jin J, Ma L H, *et al.* The role of transgenic Bt cotton in integrated insect pest management. *Acta Gossypii Sinica*, 1999, **11**(2): 57~64.
- [82] Swanton C J, Shrestha A, Roy R C, *et al.* Effect of tillage systems, N, and cover crop on the composition of weed flora. *Weed Sci.*, 1999, **47**(4): 454~461.
- [83] Yenish J P, Fry T A, Durgan B R, *et al.* Establishment of common milkweed (*Asclepias syriaca*) in corn, soybean, and wheat. *Weed Sci.*, 1997, **45**(1): 44~53.

参考文献:

- [2] 丁群星, 李元太, 戴景瑞, 等. 用子房注射法将 Bt 毒蛋白基因转入玉米及转基因植株再生. 中国科学 B 辑, 1993, **23**(7): 707~713.
- [6] 王国英, 张宏. 玉米三种转基因技术的研究. 生物工程学报, 1996, **12**(1):45~49.
- [7] 潘良文, 陈家华, 罗达, 等. 玉米花粉中转基因 Bt176 玉米的定量检测. 植物生理与分子生物学学报, 2002,**28**(6):463~467.
- [12] 刘谦, 朱鑫泉主编. 生物安全. 北京:科学出版社, 2001.
- [46] 王文军, 钱传范, 申继忠, 等. 紫外线对 Bt 伴胞晶体的损伤和腐殖酸的保护作用. 植物保护学报, 2001, **28**(1): 49~54.