

DOI: 10.5846/stxb201806061279

宋莹莹, 王龙, 李立坤, 刘向辉, 戈峰, 陈法军. 不同基因型转 *Bt* 水稻种植对土壤螨类群落影响. 生态学报, 2019, 39(12): - .

Song Y Y, Wang L, Li Z, Liu X H, Ge F, Chen F J. Effects of *Bacillus thuringiensis* rice with single and fused transgenes on the soil mite community. Acta Ecologica Sinica, 2019, 39(12): - .

## 不同基因型转 *Bt* 水稻种植对土壤螨类群落影响

宋莹莹<sup>1</sup>, 王 龙<sup>1</sup>, 李立坤<sup>1</sup>, 刘向辉<sup>2</sup>, 戈 峰<sup>2</sup>, 陈法军<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> 南京农业大学植物保护学院昆虫学系, 昆虫信息生态研究室, 南京 210095

<sup>2</sup> 中国科学院动物研究所, 北京 100101

**摘要:** 随着转基因技术的飞速发展, 越来越多的转基因作物新品种被培育成功并得以推广应用, 但转基因作物对非靶标生物的生态安全性问题日益引起人们的广泛关注。为加强转基因作物的生态风险评估, 以 *Cry1Ab* 纯合基因型转 *Bt* (*Bacillus thuringiensis*) 水稻“克螟稻”和 *Cry1Ab/Ac* 融合基因型转 *Bt* 水稻“华恢 1 号”及其对照亲本水稻稻田土壤螨类为研究对象, 系统调查研究了纯和基因型和融合基因型转 *Bt* 水稻种植下土壤螨类的群落组成、数量动态及其群落多样性的变化。研究结果显示, 转 *Bt* 水稻对土壤螨类的群落组成无负面影响, 仅一些稀有类群 (<1%) 和常见类群 (介于 1% 和 10%) 消失或出现。且与对照亲本相比, 纯和基因型转 *Bt* 水稻中仅上罗甲螨科 (*Epilohmanniidae*) 上罗甲螨属 (*Epilohmannia*) 的百分比含量显著增加了 525%。此外, 转 *Bt* 水稻与其对照亲本稻田土壤螨类的数量动态、群落多样性、群落均匀度和科属丰富度之间均差异不显著 ( $P > 0.05$ )。而与纯合基因型转 *Bt* 水稻相比, 融合基因型转 *Bt* 水稻可显著提高大田土壤螨类的数量和科属丰富度 ( $P < 0.05$ )。可见, 融合基因型转 *Bt* 水稻种植比纯合基因型转 *Bt* 水稻更有利于土壤螨类等非靶标生物的发生及其生物多样性保护。

**关键词:** 转 *Bt* 水稻; 土壤螨类; 数量动态; 群落多样性; 土壤生态安全

## Effects of *Bacillus thuringiensis* rice with single and fused transgenes on the soil mite community

SONG Yingying<sup>1</sup>, WANG Long<sup>1</sup>, LI Likun<sup>1</sup>, LIU Xianghui<sup>2</sup>, GE Feng<sup>2</sup>, CHEN Fajun<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Entomology, College of Plant Protection, Nanjing Agricultural University, Laboratory of Insect Information and Ecology, Nanjing 210095, China

<sup>2</sup> Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

**Abstract:** With the rapid development of genetic modification technology, more and more transgenic crop lines have been successfully bred and widely applied in fields, but the environmental risks on the non-target organisms have been the cause of increasing concern worldwide. In this study, the effects of different transgenic *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) rice (KMD producing single *Cry1Ab* protein as well as HH1 expressing fused *Cry1Ab/Ac* proteins) and their respective parental lines (non-transgenic rice: XSD and MH63) on the abundance dynamics and diversity of soil mites were investigated under field conditions. The results showed that transgenic *Bt* rice had no negative effect on the composition of soil mites. Only some specifically rare groups (<1%) and common groups ( $\geq 1\%$  and <10%) of soil mites disappeared or appeared in paddy field soil due to the planting of transgenic *Bt* rice. Besides, the percentage of the common group of *Epilohmannia* belonging to *Epilohmanniidae* in the paddy field soil of transgenic *Bt* rice with single *Cry1Ab* (KMD) increased by 525% compared to the paddy field soil of its parental line (XSD). The abundance dynamics showed no significant differences, and the measured indexes of Shannon diversity ( $H'$ ), Pielou evenness ( $J$ ), and Margalef's richness ( $SR$ ) of soil mites between

基金项目: 国家转基因生物新品种培育重大专项(2016ZX08012005, 2012ZX08011002)

收稿日期: 2018-06-06; 网络出版日期: 2018-00-00

\* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: fajunchen@njau.edu.cn

the paddy fields of transgenic *Bt* rice (KMD and HH1) and their respective parental lines (XSD and MH63) throughout the growth season ( $P>0.05$ ). However, compared with the planting of transgenic *Bt* rice with a single *Cry1Ab* transgene, the planting of transgenic *Bt* rice with fused *Cry1Ab/Ac* transgenes resulted in significant increase in the abundance and genus richness of the soil mites ( $P<0.05$ ). It is presumed that the planting of transgenic *Bt* rice with fused *Cry1Ab/Ac* transgenes in contrast to single *Cry1Ab* transgene is advantageous for the occurrence and diversity conservation of non-target organisms (including soil mites).

**Key Words:** transgenic *Bt* rice; soil mite; abundance dynamics; community diversity; soil environmental safety

为减轻化学农药使用过程中造成的系列环境问题,进而促进我国“新绿色农业”的发展,基因工程技术已被广泛应用于现代农业害虫防治中<sup>[1]</sup>。室内或田间条件下,*Cry1Ab* 纯合基因型转 *Bt* (*Bacillus thuringiensis*) 水稻“克螟稻”及 *Cry1Ab/Ac* 融合基因型转 *Bt* 水稻“华恢 1 号”均具有较好的抗虫效果<sup>[2-3]</sup>,并有效地降低了农药施用<sup>[4]</sup>,且我国农业部于 2009 年和 2014 年先后两次通过对转 *Bt* 抗虫水稻“华恢 1 号”的生物安全认证<sup>[5-6]</sup>。然而,人们对转基因作物的食品安全和生态风险问题仍存在较大争议,这严重阻碍了我国 115 转基因抗虫育种产业的发展。

虽然大量研究表明,转 *Bt* 作物对地上部节肢动物以及水生生物等的影响与非转基因作物相比均无显著差异<sup>[7-11]</sup>。但转 *Bt* 作物长期种植后,其外源基因表达产物也可能通过根系分泌物、花粉或植株残体等方式进入土壤,进而对土壤非靶标生物造成负面作用<sup>[12-14]</sup>。此外,不同基因型转 *Bt* 水稻对非靶标生物的影响存在较大差异<sup>[15-16]</sup>,且易受土壤类型以及气候等多因素影响。因此不同基因型转 *Bt* 水稻对土壤非靶标生物的综合评价至关重要,但目前有关这方面的研究还相当有限,尤其对土壤生态安全性评价的工作尚严重不足。

土壤螨类是土壤中数量和种类极为丰富的一类小型土壤节肢动物,在土壤分解、物质循环和能量流动等过程中均起着重要作用<sup>[17-19]</sup>。同时,土壤螨类也是自然界易受干扰的生物类群,其种类组成和密度能对土壤环境变化做出敏感响应<sup>[20-22]</sup>。因此,土壤螨类已成为评价土壤健康与否的重要敏感指示生物之一<sup>[23]</sup>。研究不同基因型转 *Bt* 水稻种植对土壤螨类群落影响对转 *Bt* 水稻种植和土壤环境安全具有重要意义。然而有关转 *Bt* 抗虫水稻对土壤螨类的安全风险评价尚未见报道。为综合评价不同基因型转 *Bt* 水稻种植对土壤非靶标生物的影响,加强转基因作物的生态风险评估,本研究选取 *Cry1Ab* 纯合基因型转 *Bt* 水稻“克螟稻”和 *Cry1Ab/Cry1Ac* 融合基因型转 *Bt* 水稻“华恢 1 号”为供试材料,研究不同基因型转 *Bt* 水稻种植对稻田非靶标生物土壤螨类的数量动态、群落组成和多样性等的影响,以进一步明确转 *Bt* 水稻的土壤环境安全性。

## 1 材料与方法

### 1.1 田间试验地概况

试验地设在山东省宁津县南京农业大学植物保护学院“气候变化与生物多样性和控害减排【联合】创新研究基地”(Innovation Research Platforms for Climate Change, Biodiversity and Pest Management, 即 CCBPM; <http://www.ccbpm.org>; 37.64°N, 116.8°E),该地区海拔 16.5 m,属于暖温带半湿润季风性气候,年平均气温 12.9°C,年平均降水量为 500—800 mm;土壤类型为蒙淤砂白土,耕作层(0—20 cm)的土壤 pH 值(水提法,液土比 5:1)为 8.5,土壤有机碳(高温外热重铬酸钾氧化-容量法)、全氮(凯氏消煮法)、碱解氮(碱解扩散法)、速效磷(钼蓝比色法)和速效钾(火焰光度计法)含量分别为 6.6 g/kg、0.4 g/kg、7.9 g/kg、14.4 mg/kg 和 96 mg/kg。试验前该地区主要种植棉花、玉米和小麦等旱地作物,未进行秸秆还田耕作,无转 *Bt* 水稻种植记载,且当前周边 100 km 内也无转 *Bt* 水稻种植,从而避免了转 *Bt* 作物外源 *Bt* 基因的扩散杂交风险。整个试验过程除不施用化学杀虫剂外,其他均按照常规的稻田管理措施。

### 1.2 供试转 *Bt* 水稻

试验所用的转 *Bt* 水稻为 2 个转 *Cry1A* 基因抗虫水稻品系,即 *Cry1Ab* 纯和基因型转 *Bt* 水稻“克螟稻”和

*Cry1Ab/Ac* 融合基因型转 *Bt* 水稻“华恢 1 号”(两者均为恢复系),及其常规对照亲本“秀水 11”和“明恢 63”。克螟稻是将外源 *Cry1Ab* 基因导入晚粳稻秀水 11 后选育出的转 *Bt* 抗虫基因水稻,稻种由浙江大学原子能研究所提供;华恢 1 号以明恢 63 为受体材料,通过基因枪介导的遗传转化方法将目的基因 *Cry1Ab/Ac* 转入受体细胞后所得的转 *Bt* 抗虫水稻,稻种由华中农业大学植物科技学院提供。以上两种转 *Bt* 抗虫水稻的靶标害虫为二化螟 *Chilo suppressalis* 和稻纵卷叶螟 *Cnaphalocrocis medinalis* 等鳞翅目害虫<sup>[2-3]</sup>。

### 1.3 试验设计

试验包含 *Cry1Ab* 纯和基因型转 *Bt* 水稻“克螟稻”和 *Cry1Ab/Ac* 融合基因型转 *Bt* 水稻“华恢 1 号”及其常规对照亲本“秀水 11”和“明恢 63”,共 4 个水稻品种。每个水稻品种设置 4 个小区,每小区 5 m×20 m,小区之间设置 5 m 的隔离带,水稻品种之间采用随机区组试验设计(图 1)。水稻于 2011 年 5 月 15 日旱作播种,11 月 15 日收获。播种前按每公顷 375 kg 氮肥、225 kg 磷肥和 150 kg 钾肥施底肥,大田漫灌一次,并于水稻拔节期和孕穗期分别追施氮肥(150 kg/hm<sup>2</sup>)、磷肥(90 kg/hm<sup>2</sup>)和钾肥(60 kg/hm<sup>2</sup>)各一次;此外,播种后间隔 3 周人工除草和灌溉各一次。自水稻播种后一个月,每隔两个月进行一次土壤采样,即 6 月份、8 月份和 10 月份 3 次采样。采样时,用 100 mL 环刀每小区随机取样 5 环刀水稻土,放入一个自封袋中,做好标记后带回实验室分别进行分离鉴定。

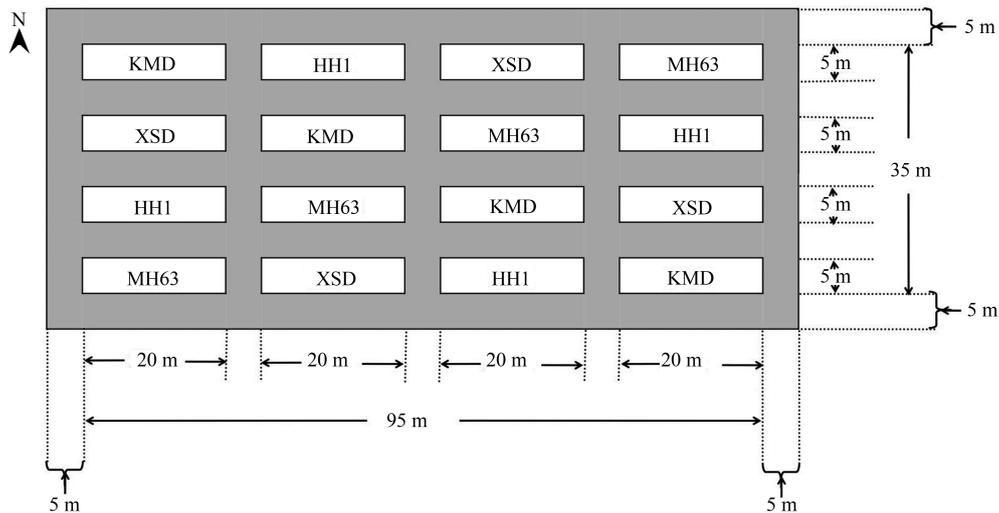


图 1 *Cry1Ab* 纯和基因型和 *Cry1Ab/Ac* 融合基因型转 *Bt* 水稻及其对照亲本大田试验设置图

Fig.1 Field layout and deployment diagram of transgenic *Bt* rice with single *Cry1Ab* and fused *Cry1Ab/Ac* transgenes and their respectively parental lines

KMD: 克螟稻, Kemingdao; XSD: 秀水稻, Xiushuidao; HH1: 华恢 1 号, Huahui 1; MH63: 明恢 63, Minghui 63

### 1.4 土壤螨类分离与鉴定

将带回的每个土样充分混合后,用 100 mL 标准环刀量取一环刀(即 100 mL)土样采用改良的干漏斗法(即 Tullgren 法)进行土壤螨类的分离,获得的土壤螨用装有浓度为 75%酒精的白色塑料小瓶(容积:50 mL)收集<sup>[24]</sup>。螨类标本依据尹文英《中国土壤动物检索图鉴》鉴定<sup>[25]</sup>,一般鉴定到属,个别鉴定到科,同时统计个体数量。此外,根据各土壤螨的数量占土壤螨总数的百分比来划分各类群,即个体数占总量 10%以上者为优势类群,个体数占总量 1%—10%为常见类群,个体数占总量 1%以下为稀有类群<sup>[26]</sup>。

### 1.5 土壤螨类群落指标计算

依据以上分离鉴定的各土壤螨的类群及其数量,运用 Shannon 多样性指数、Margalef 丰富度指数和 Pielou 均匀度指数来研究<sup>[27]</sup> *Cry1Ab* 纯和基因型和 *Cry1Ab/Ac* 融合基因型转 *Bt* 水稻种植对土壤螨类群落多样性的影响。

具体公式如下:

(1) Shannon 多样性指数( $H'$ ):

$$H = - \sum_{i=1}^s P_i \ln P_i$$

式中, $P_i$  为土壤螨群落中第  $i$  类群(属)个体数占总个体数的百分比; $S$  为土壤螨群落中所有螨的类群数。

(2) Margalef 丰富度( $SR$ ):

$$SR = (S - 1) / \ln N$$

其中, $S$  的含义同上, $N$  为土壤螨类群落的总个体数。

(3) Pielou 均匀度( $J$ ):

$$J = H / \ln S$$

式中, $H'$ ,  $S$  的含义同上。

## 1.6 统计分析

用 SPSS 16.0 统计软件进行试验数据的统计分析。采用单因子方差分析(One-way ANOVA)比较 2011 年 6、8 和 10 月份 3 次累计分离鉴定的转 *Bt* 水稻及其对照亲本稻田土壤螨类的百分比组成差异,以及同一次调查取样所分离鉴定的土壤螨类数量和测定的 Shannon 多样性指数( $H'$ )、Margalef 丰富度( $SR$ )和 Pielou 均匀度( $J$ )等的差异;此外,采用单因子重复测量方差分析(One-way Repeated-Measures ANOVAs)以明确转 *Bt* 水稻及其对照亲本之间(KMD vs. XSD 或 HH1 vs. MH63),以及不同基因型转 *Bt* 水稻之间(KMD vs. HH1)在 2011 年 6、8 和 10 月份稻田土壤螨类数量动态,以及测定的 Shannon 多样性指数( $H'$ )、Margalef 丰富度( $SR$ )和 Pielou 均匀度( $J$ )等的群落指标的动态差异。处理间差异显著性采用 LSD 检验(差异显著: $P < 0.05$ ;差异较大但不显著: $0.05 < P < 0.10$ )。数据分析前,对绝对值数据进行对数转换,对百分比数据进行反正弦平方根转化,以符合正态分布假设。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同基因型转 *Bt* 水稻种植对稻田土壤螨类数量与百分比组成的影响

2011 年 6 月份、8 月份和 10 月份连续 3 次对两种基因型(即 *Cry1Ab* 纯和基因型和 *Cry1Ab/Ac* 融合基因型)转 *Bt* 水稻及其对照亲本稻田土壤进行了土壤取样,以及土壤螨类的分离与鉴定,共发现 4 目,27 科土壤螨类(表 1)。*Cry1Ab/Ac* 融合基因型转 *Bt* 水稻种植增加了土壤螨类的科属种类;其中,*Cry1Ab* 纯和基因型转 *Bt* 水稻及其对照亲本稻田土壤中分别发现了 17 科和 18 科的土壤螨类,*Cry1Ab/Ac* 融合基因型转 *Bt* 水稻及其对照亲本稻田土壤中分别发现 21 科和 17 科的螨类。

对科属组成及其百分比分析发现(表 1),同一转 *Bt* 水稻种植对不同的土壤螨类影响不同,不同基因型转 *Bt* 水稻种植对同一土壤螨类的影响也不同,且转 *Bt* 水稻种植田中一些百分比含量较少的稀有类群( $< 1\%$ )和常见类群(介于  $1\%$  和  $10\%$ )消失或出现。与对照亲本稻田土壤相比,*Cry1Ab* 纯和基因型转 *Bt* 水稻田土壤中分别有 3 个科的稀有类群(赫甲螨科、真卷甲螨科和寄螨科)和 3 个科的常见类群(步甲螨科、盖头甲螨科和绒螨科)消失,同时又有 1 个科的稀有类群(若甲螨科)和 6 个科的常见类群(尖棱甲螨科(奥斯甲螨属)、木单翼甲螨科(木单翼甲螨属和全单翼甲螨属)、奥甲螨科(奥甲螨属)、厚厉螨科、尾足螨科和巨须螨科)出现;此外,*Cry1Ab/Ac* 融合基因型转 *Bt* 水稻田土壤中分别有 1 个科的稀有类群(奥甲螨科(微奥甲螨属)) and 3 个科的常见类群(真卷甲螨科、奥甲螨科(多奥甲螨和隐奥甲螨属)和吸螨科)消失,同时又有 6 个科的稀有类群(上罗甲螨科、维螨科、尾足螨科、寄螨科、真足螨科和绒螨科)和 1 个科常见类群(奥甲螨科(奥甲螨属))出现。其中,*Cry1Ab* 纯和基因型和 *Cry1Ab/Ac* 融合基因型转 *Bt* 水稻种植均可导致真卷甲螨科三皱甲螨属种类的消失,以及盖头甲螨科奥甲螨属和尾足螨科种类的出现。与对照亲本相比,*Cry1Ab* 纯和基因型转 *Bt* 水稻种植显著增加了上罗甲螨科上罗甲螨属的百分比含量( $+525\%$ ;  $P < 0.05$ ; 表 1),而 *Cry1Ab/Ac* 融合基因型转 *Bt* 水稻种植对稻田土壤螨的百分比组成无显著影响( $P > 0.05$ ; 表 1)。

表 1 *Cry1Ab* 纯合基因型和 *Cry1Ab/Ac* 融合基因型转 *Bt* 水稻稻田土壤螨类优势类群 (>10%)、常见类群 (介于 1%和 10%) 和稀有类群 (<1%) 组成 (%)

Table 1 Composition and structure of the dominant (>10%), common ( $\geq 1\%$  and <10%) and rare (<1%) groups of soil mites genus in the paddyfields of transgenic *Bt* rice with single *Cry1Ab* and fused *Cry1Ab/Ac* transgenes (%)

目 Order	科 Family	属 Genus	<i>Cry1Ab</i> 纯和基因型 Single <i>Cry1Ab</i> transgene		<i>Cry1Ab/Ac</i> 融合基因型 Fused <i>Cry1Ab/Ac</i> transgenes	
			转 <i>Bt</i> 水稻 (克螟稻) Transgenic <i>Bt</i> rice (KMD)	对照亲本 (秀水 11) Parental line (XSD)	转 <i>Bt</i> 水稻 (华恢 1 号) Transgenic <i>Bt</i> rice (HH1)	对照亲本 (明恢 63) Parental line (MH63)
甲螨目	缝甲螨科 Hypochthoniidae	缝甲螨属 <i>Hypochthonius</i>	7.0±3.3	4.4±1.5	10.0±4.2	0.6±0.6
Oribatida	步甲螨科 Carabodidae	步甲螨属 <i>Carabodes</i>	—	1.3±1.3	—	—
	赫甲螨科 Hermannidae	赫甲螨属 <i>Hermannia</i>	—	0.9±0.9	—	—
	尖棱甲螨科 Ceratozetes	尖棱甲螨属 <i>Ceratozetes</i>	8.4±1.3	7.4±2.2	9.0±4.4	10.1±3.1
		奥斯甲螨属 <i>Ocesobates</i>	3.6±2.2	—	—	—
	真卷甲螨科 Euphthiracaridae	三皱甲螨属 <i>Rhysotritia</i>	—	0.9±0.9	—	1.0±1.0
	上罗甲螨科 Epilohmanniidae	上罗甲螨属 <i>Epilohmannia</i>	7.5±1.1 a	1.2±0.8 b	0.8±0.8	—
	木单翼甲螨科 Xylobatidae	木单翼甲螨属 <i>Xylobates</i>	2.4±2.4	—	6.0±1.2	2.6±1.6
		全单翼甲螨属 <i>Perxylobates</i>	1.6±1.6	—	0.8±0.8	1.0±1.0
	盖头甲螨科 Tectocephidae	盖头甲螨属 <i>Tectocephus</i>	—	2.1±1.7	3.1±2.2	3.0±3.0
	奥甲螨科 Oppiidae	奥甲螨属 <i>Oppia</i>	1.3±1.3	—	1.7±1.0	—
		多奥甲螨 <i>Multioppia</i> Hammer	0.8±0.8	0.9±0.9	—	2.9±1.7
		隐奥甲螨属 <i>Cryptoppia</i> Csiszar	—	—	—	1.0±1.0
		微奥甲螨属 <i>Micropoppia</i>	—	—	—	0.7±0.7
		若甲螨科 Oribatulidae	合若甲螨属 <i>Zygoribatula</i>	0.8±0.8	—	—
中气目	维螨科 Veigaiidae	—	—	0.7±0.7	—	
Mesostigmata	囊螨科 Ascidae	—	26.8±5.5	25.5±5.6	19.9±6.8	35.0±11.7
	厉螨科 Laelapidae	—	1.2±1.2	1.3±1.3	1.6±1.6	0.6±0.6
	胭螨科 Rhodacaridae	胭螨属 <i>Rhodacarus</i>	9.4±5.6	14.8±2.5	6.9±1.4	9.2±3.2
		小胭螨属 <i>Rhodacarellus</i>	—	—	0.7±0.7	1.7±1.7
	厚厉螨科 Pachylaelapidae	—	1.3±1.3	—	—	—
	尾足螨科 Uropodidae	—	2.9±1.7	—	0.3±0.3	—
	植绥螨科 Phytoseiidae	—	1.3±1.3	0.9±0.9	0.3±0.3	1.7±1.7
	寄螨科 Parasitidae	—	—	0.9±0.9	0.8±0.8	—
	派盾螨科 Parholaspididae	—	—	—	6.3±5.3	2.6±1.6
	前气目	真足螨科 Eupodidae	—	—	0.7±0.7	—
Prostigmata	长须螨科 Stigmaeidae	长须螨属 <i>Stigmaeus</i>	3.6±2.2	9.7±7.5	7.1±2.7	4.2±1.5
	微离螨科 Microdispididae	奇矮螨属 <i>Allopygmephorus</i>	11.2±6.2	13.6±1.8	12.4±6.5	15.0±3.3
	绒螨科 Trombidiidae	—	—	1.3±1.3	0.7±0.7	—
	吸螨科 Bdellidae	—	—	—	—	1.9±1.9
	巨须螨科 Cunaxidae	巨须螨属 <i>Cunaxa</i>	3.0±2.1	—	3.0±1.2	2.5±1.8
无气目	食菌螨科 Anoetidae	—	1.6±1.6	0.3±0.3	2.7±2.3	1.6±1.0
Astigmata	粉螨科 Acaridae	—	2.1±1.3	12.7±9.5	4.7±1.8	1.2±1.2

不同小写字母表示经 LSD 检验转 *Bt* 水稻及其对照亲本稻田土壤螨的百分比组成差异显著,  $P < 0.05$

## 2.2 转 *Bt* 水稻对土壤螨类数量动态和群落多样性的影响

根据 6、8 和 10 月份 3 次调查结果分析得出, 转 *Bt* 水稻种植没有显著影响土壤螨类的数量, 以及群落多样性、均匀度和科属丰富度 ( $P > 0.05$ ; 表 2), *Cry1Ab/Ac* 融合基因型转 *Bt* 水稻种植对土壤螨类科属丰富度的影响较大 ( $P = 0.072 < 0.10$ ; 表 2)。其中, 相对于对照亲本而言, 3 次调查期间 *Cry1Ab/Ac* 融合基因型转 *Bt* 水稻

种植提高了土壤螨类数量,以及群落多样性、均匀度和科属丰富度,而 *Cry1Ab* 纯和基因型转 *Bt* 水稻种植仅明显提高了土壤螨类群落均匀度(图 2)。

与对照亲本相比,*Cry1Ab* 纯合基因型转 *Bt* 水稻种植显著降低了 10 月份单位面积稻田土壤中螨类数量(-72%;  $P < 0.05$ )和科属丰富度(-38%;  $P < 0.05$ ),同时又显著提高了 8 月份稻田土壤螨类均匀度(+15%;  $P < 0.05$ );此外,*Cry1Ab/Ac* 融合基因型转 *Bt* 水稻种植还显著提高了 10 月份土壤螨类群落多样性(+53%;  $P < 0.05$ ; 图 2)。

表 2 转 *Bt* 水稻及其亲本种植对稻田土壤螨类数量和群落多样性影响的单因子重复测量方差分析( $F/P$  值)

Table 2 One-way repeated-measures ANOVAs for the effects of the planting of transgenic *Bt* rice and their corresponding parental lines of non-*Bt* rice on the abundance and community diversity of soil mites in paddyfields ( $F/P$  values)

土壤螨类测定指标 Measured indices of soil mites	<i>Cry1Ab</i> 纯合基因型 (克螟稻 vs. 秀水 11) Single <i>Cry1Ab</i> transgene (KMD vs. XSD)	<i>Cry1Ab/Ac</i> 融合基因型 (华恢 1 号 vs. 明恢 63) Fused <i>Cry1Ab/Ac</i> transgenes (HH1 vs. MH63)
数量/100 mL Abundance (Individuals per 100 mL soil)	0.01/0.92	1.48/0.24
群落多样性( $H'$ ) Shannon diversity ( $H'$ )	0.07/0.80	2.68/0.12
群落均匀度( $J$ ) Pielou's evenness ( $J$ )	0.99/0.33	0.50/0.49
科属丰富度( $S$ ) Margalef's richness ( $SR$ )	0.13/0.73	3.60/0.072*

\* 表示转 *Bt* 水稻及其对照亲本之间经 LSD 检验差异较大,  $P < 0.10$ ; 该分析方法以转基因处理(*Bt* vs. non-*Bt*)为主因子,以 2011 年 6 月、8 月和 10 月 3 次采样日期为重复测量

### 2.3 不同基因型转 *Bt* 水稻种植对土壤螨类数量和群落多样性的影响

根据 6、8 和 10 月份 3 次调查结果分析得出(表 3),不同基因型转 *Bt* 水稻种植显著影响了土壤螨类数量( $P = 0.035 < 0.05$ )和科属丰富度( $P = 0.043 < 0.05$ ),但对群落多样性( $P = 0.21 > 0.05$ )和均匀度( $P = 0.86 > 0.05$ ; 表 3)的影响不显著。其中,相对于 *Cry1Ab* 纯合基因型转 *Bt* 水稻而言,*Cry1Ab/Ac* 融合基因型转 *Bt* 水稻种植显著提高了土壤螨类数量和群落科属丰富度( $P < 0.05$ ),并提高了群落多样性和均匀度,但差异不显著( $P > 0.05$ ; 图 3)。

与 *Cry1Ab* 纯合基因型转 *Bt* 水稻相比,*Cry1Ab/Ac* 融合基因型转 *Bt* 水稻种植显著提高了 6、8 和 10 月份单位面积稻田土壤中螨类数量,提高达 284%、28% 和 124% ( $P < 0.05$ );并显著提高了 10 月份稻田土壤螨类群落多样性,提高达 34% ( $P < 0.05$ );此外,还显著提高了 6 月份和 10 月份稻田土壤螨类科属丰富度,提高达 113% 和 75% ( $P < 0.05$ ; 图 3)。

表 3 转 *Bt* 水稻种植对稻田土壤螨类数量和群落多样性影响的单因子重复测量方差分析( $F/P$  值)

Table 3 One-way repeated-measures ANOVAs for the effects of transgenic *Bt* rice planting on the abundance and community diversity of soil mites in paddyfields ( $F/P$  values)

测定指标 Measured indices	<i>Cry1Ab</i> 纯合基因型与 <i>Cry1Ab/Ac</i> 融合基因型 转 <i>Bt</i> 水稻相比(克螟稻 vs. 华恢 1 号) Transgenic <i>Bt</i> rice with single <i>Cry1Ab</i> transgene vs. fused <i>Cry1Ab/Ac</i> transgenes (KMD vs. HH1)
数量/100 mL Abundance (Individuals per 100 mL soil)	5.82/0.035*
群落多样性( $H'$ ) Shannon diversity index ( $H'$ )	1.65/0.21
群落均匀度( $J$ ) Pielou's evenness index ( $J$ )	0.03/0.86
科属丰富度( $S$ ) Margalef's richness index ( $SR$ )	4.22/0.043*

\* 表示转 *Bt* 水稻之间经 LSD 检验差异显著,  $P < 0.05$ ; 该分析方法以基因型(*Cry1Ab* 纯合基因型和 *Cry1Ab/Ac* 融合基因型)为主因子,以 2011 年 6 月、8 月和 10 月 3 次采样日期为重复测量

### 3 讨论

随着众多转 *Bt* 抗虫作物培育成功并广泛种植,在其有效控制鳞翅目等靶标害虫发生为害的同时,其非靶

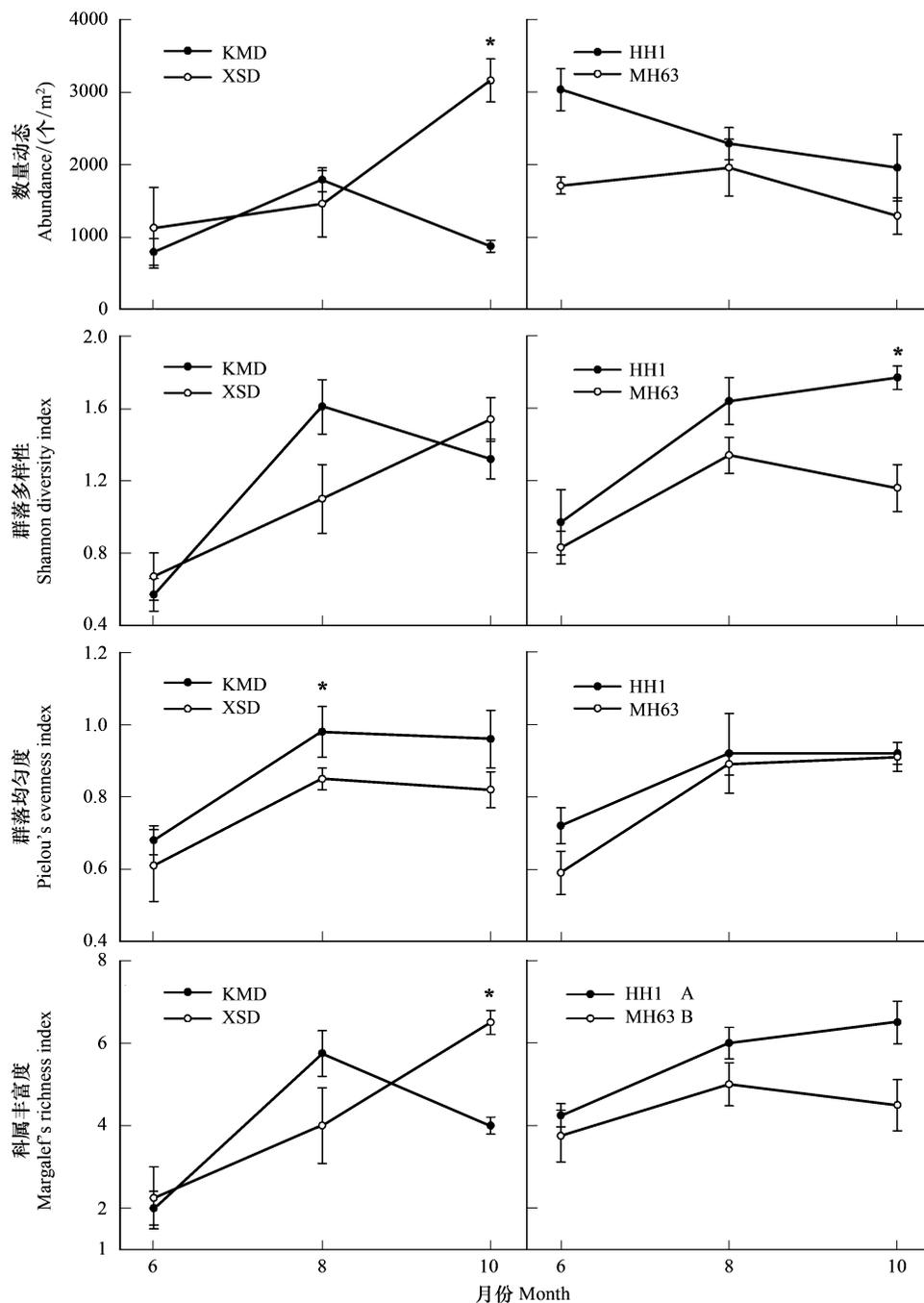


图2 转 *Bt* 水稻及其对照亲本稻田土壤螨类数量和群落多样性动态

Fig.2 Dynamics of individual abundance and community diversity of soil mites in paddyfields of transgenic *Bt* rice and their corresponding parental lines of non-*Bt* rice

\* 表示转 *Bt* 水稻及其对照亲本之间经 LSD 检验差异显著,  $P < 0.05$ ; 不同大写字母表示连续 3 次调查转 *Bt* 水稻及其对照亲本间经 LSD 检验差异显著,  $P < 0.05$

标生物安全性越来越受到普遍关注<sup>[16, 28-29]</sup>。而随着转 *Bt* 作物长期种植后,其外源基因表达产物也可能通过根系分泌物、花粉或植株残体等方式进入土壤,从而对土壤非靶标生物造成负面作用<sup>[12-14]</sup>。土壤中,大量的无脊椎动物与植物根系和土壤相互作用,在土壤生态系统中扮演着非常重要的功能生物角色<sup>[30]</sup>。作为土壤生态系统中重要的功能生物之一,土壤螨类的群落结构与组成通常是相对稳定的,但当土壤环境受到干扰时土壤螨类会做出及时响应<sup>[20]</sup>。本研究发现,与对照亲本相比, *Cry1Ab* 纯合基因型(克螟稻)和 *Cry1Ab/Ac* 融合

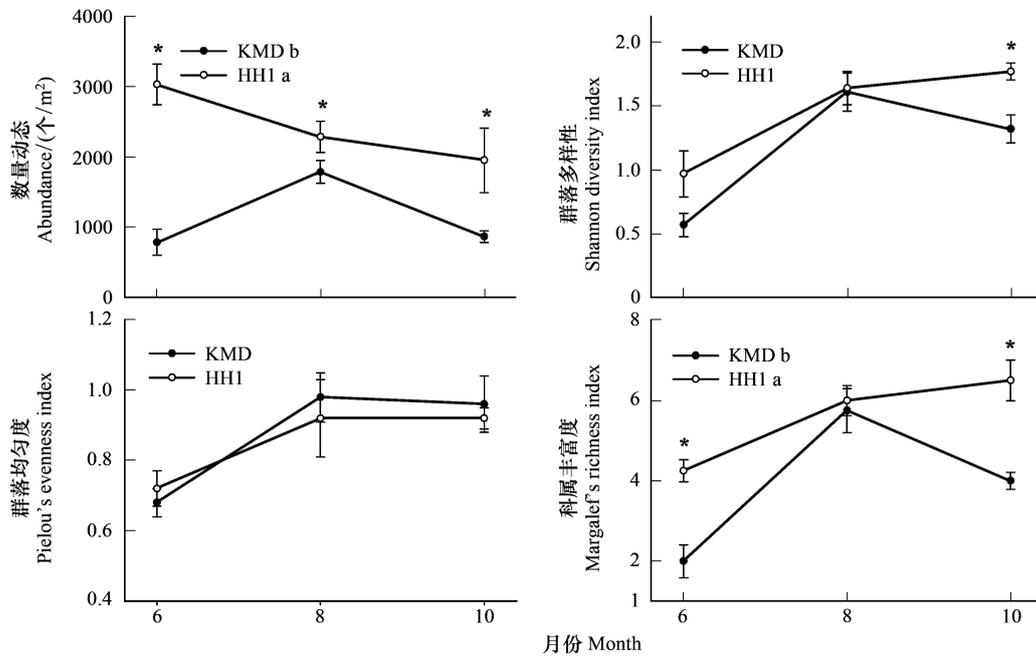


图3 转 *Bt* 水稻稻田土壤螨类数量和群落多样性动态

Fig.3 Dynamics of individual abundance and community diversity of soil mites in paddyfields of transgenic *Bt* rice

\* 表示转 *Bt* 水稻之间经 LSD 检验差异显著,  $P < 0.05$ ; 不同小写字母表示连续 3 次调查转 *Bt* 水稻间经 LSD 检验差异显著,  $P < 0.05$

基因型(华恢 1 号)转 *Bt* 水稻种植田中, 出现一些稀有类群 (<1%) 和常见类群 (介于 1% 和 10%) 消失或出现的现象。这可能与转 *Bt* 水稻的种植有关, 也可能与稀有类群较强的随机性和土壤螨类的空间异质性有关。*Cry1Ab* 纯和基因型转 *Bt* 水稻中仅上罗甲螨属的百分比含量显著高于其对照亲本, 而其他土壤螨类百分比含量均未出现显著性的差异。由此表明, 上罗甲螨属对 *Cry1Ab* 纯和基因型转 *Bt* 水稻的种植更敏感。此外, 真卷甲螨科三皱甲螨属均未在 *Cry1Ab* 纯合基因型和 *Cry1Ab/Ac* 融合基因型转 *Bt* 水稻稻田土壤中发现, 且盖头甲螨科奥甲螨属和尾足螨科仅在这两类基因型转 *Bt* 水稻稻田土壤中发现。可见, 以上受影响较大的上罗甲螨属、三皱甲螨属和尾足螨科等土壤螨类可作为转 *Bt* 水稻种植对土壤生态安全性评价与环境监测的指示物种。

土壤是生态系统中物质循环和能量转化过程中重要的场所, 而土壤生物的多样性是土壤多种功能的基础<sup>[31]</sup>。本研究结果显示 *Cry1Ab* 纯合基因型和 *Cry1Ab/Ac* 融合基因型转 *Bt* 水稻种植对 6、8 和 10 月份连续 3 次调查的土壤螨类数量发生动态, 以及群落多样性、均匀度和科属丰富度等指标动态均无显著影响。在相同试验条件下, *Cry1Ab* 纯合基因型和 *Cry1Ab/Ac* 融合基因型转 *Bt* 水稻经过三年连续种植后, 土壤中 *Bt* 蛋白的含量未超过  $0.12 \text{ ng g}^{-1}$ <sup>[15]</sup>, 推测该 *Bt* 蛋白浓度尚不能对土壤螨类多样性产生显著影响。Liu 研究指出在外界环境 (如降雨、温度、光照等) 的影响下, 转 *Bt* 作物外源 *Bt* 毒素对非靶标生物的影响微不足道<sup>[29]</sup>。且转 *Bt* 水稻中的外源 *Cry1Ab* 蛋白在土壤中降解的速度非常快, 一个月降解高达 50%<sup>[32]</sup>。祝向钰研究了转 *Bt* 水稻对土壤跳虫的影响, 与对照亲本相比也无显著差异<sup>[33]</sup>。尽管本研究未发现转 *Bt* 水稻种植对土壤非靶标生物有负面影响, 但其是否有累积效应仍需长期监测。此外, 本研究还得出 *Cry1Ab/Ac* 融合基因型转 *Bt* 水稻种植对 6、8 和 10 月份连续 3 次调查的土壤螨类群落科属丰富度的影响较大 ( $P = 0.072 < 0.10$ ; 表 2)。另一方面, 与对照亲本相比, *Cry1Ab* 纯合基因型转 *Bt* 水稻种植显著降低了 10 月份单位面积稻田土壤中螨类数量和科属丰富度, 同时又显著提高了 8 月份稻田土壤螨类均匀度, *Cry1Ab/Ac* 融合基因型转 *Bt* 水稻种植还显著提高了 10 月份土壤螨类群落多样性, 且 3 次调查期间 *Cry1Ab/Ac* 融合基因型转 *Bt* 水稻种植提高了土壤螨类数量及群落多样性、均匀度、科属丰富度。可见, 相对于对照亲本而言, 转 *Bt* 水稻 (尤其是 *Cry1Ab/Ac* 融合基因型转 *Bt* 水稻) 种植有提高稻田土壤螨类数量和群落多样性、均匀性和科属丰富度的趋势, 且影响存在时间动态差异。

通过比较 *Cry1Ab* 纯和基因型和 *Cry1Ab/Ac* 融合基因型转 *Bt* 水稻种植对稻田土壤螨类数量和相关群落参数的影响发现, *Cry1Ab/Ac* 融合基因型转 *Bt* 水稻显著增加了土壤螨类的数量和科属丰富度。可见, 在科属分类水平上, 相对于 *Cry1Ab* 纯和基因型转 *Bt* 水稻种植而言, *Cry1Ab/Ac* 融合基因转 *Bt* 水稻种植在提高土壤螨类群落稳定性方面发挥着更大的优势, 而在物种水平 *Cry1Ab/Ac* 融合基因转 *Bt* 水稻种植是否更有利于非靶标生物的数量发生和群落多样性的保护有待进一步研究。Chen 报道了 *Cry1Ab* 纯和基因型转 *Bt* 水稻(克螟稻)及其对照亲本(秀水 11)稻田土壤线虫的数量与 *Cry1Ab/Ac* 融合基因型转 *Bt* 水稻(华恢 1 号)及其对照亲本(明恢 63)间存在显著的差异, 且前者显著高于后者<sup>[15]</sup>。可见, 同一转 *Bt* 水稻种植对不同的土壤非靶标生物的影响不同, 且不同基因型转 *Bt* 水稻种植对同一土壤非靶标生物的影响也不尽相同。同时 Chen 也发现上述两种转 *Bt* 水稻种植对土壤中 *Bt* 蛋白的浓度无显著影响, 但前者稻田土壤中硝酸氮的含量显著高于后者<sup>[15]</sup>, 推测不同基因型转 *Bt* 水稻稻田土壤螨类的数量和科属丰富度的差异与土壤中硝酸氮浓度的变化有关, 且呈负相关关系。本研究只开展了一年期 *Cry1Ab* 纯和基因型和 *Cry1Ab/Ac* 融合基因型转 *Bt* 水稻短期种植对稻田土壤螨类数量及其群落组成等的影响, 而长期种植转 *Bt* 水稻是否会对土壤螨类等非靶标生物的影响存在累积效应, 进而造成更大的潜在影响仍需要更持久的田间检测与监测试验的开展。

#### 4 结论

通过研究 *Cry1Ab* 纯合基因型和 *Cry1Ab/Ac* 融合基因型转 *Bt* 水稻种植对稻田非靶标生物土壤螨类的数量动态、群落组成和多样性等的影响得出, 转 *Bt* 水稻种植田仅个别稀有类群或常见类群消失或出现。其中, *Cry1Ab* 纯和基因型转 *Bt* 水稻种植显著增加了稻田土壤中上罗甲螨科上罗甲螨属的百分比含量。此外, *Cry1Ab/Ac* 融合基因型和 *Cry1Ab* 纯合基因型转 *Bt* 水稻种植对稻田土壤螨类的数量动态、群落多样性、群落均匀度和科属丰富度等的影响都不显著。可见, 转 *Bt* 水稻种植并未显著改变土壤螨类的群落组成和数量动态等。与 *Cry1Ab* 纯合基因型转 *Bt* 水稻相比, *Cry1Ab/Ac* 融合基因型转 *Bt* 水稻种植显著提高了稻田非靶标生物土壤螨类的数量和科属丰富度, 进而表明 *Cry1Ab/Ac* 融合基因型转 *Bt* 水稻种植比 *Cry1Ab* 纯合基因型转 *Bt* 水稻更有利于土壤螨类等非靶标生物的数量发生及其群落多样性保护。本研究的开展进一步明确了不同基因型转 *Bt* 水稻种植对土壤非靶标生物的影响, 并为综合评价转 *Bt* 作物土壤环境安全性提供了试验数据支持。

#### 参考文献 (References):

- [ 1 ] 康卓. 转基因作物与化学农药. 农药, 2012, 51(1): 1-3.
- [ 2 ] Shu Q Y, Ye G Y, Cui H R, Cheng X Y, Xiang Y B, Wu D X, Gao M W, Xia Y W, Hu C, Sardana R, Altosaar I. Transgenic rice plants with a synthetic *Cry1Ab* gene from *Bacillus thuringiensis* were highly resistant to eight lepidopteran rice pest species. *Molecular Breeding*, 2000, 6(4): 433-439.
- [ 3 ] Wang Y M, Zhang G A, Du J P, Liu B, Wang M C. Influence of transgenic hybrid rice expressing a fused gene derived from *Cry1Ab* and *Cry1Ac* on primary insect pests and rice yield. *Crop Protection*, 2010, 29(2): 128-133.
- [ 4 ] 张敏恒. 转基因作物与农药. 农药, 2000, 39(4): 1-5.
- [ 5 ] Li Y H, Hallerman E M, Liu Q S, Wu K M, Peng Y F. The development and status of *Bt* rice in China. *Plant Biotechnology Journal*, 2016, 14(3): 839-848.
- [ 6 ] Lu C M. The first approved transgenic rice in China. *GM Crops*, 2010, 1(3): 113-115.
- [ 7 ] Ren S P, Yang F, Gao M Q, Pu D Q, Shi M, Ye G Y, Shen Z C, Chen X X. Effects of transgenic *Bt* rice on nontarget *Rhopalosiphum maidis* (Homoptera: Aphididae). *Environmental Entomology*, 2016, 45(4): 1090-1096.
- [ 8 ] Zhao Y, Zhang S, Luo J Y, Wang C Y, Lv L M, Wang X P, Cui J J, Lei C L. *Bt* proteins *Cry1Ah* and *Cry2Ab* do not affect cotton aphid *Aphis gossypii* and ladybeetle *Propylea japonica*. *Scientific Reports*, 2016, 6: 20368.
- [ 9 ] Zhang L, Guo R Q, Fang Z X, Liu B. Genetically modified rice *Bt-Shanyou63* expressing *Cry1Ab/c* protein does not harm *Daphnia magna*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2016, 132: 196-201.
- [ 10 ] 桂芳艳, 刘雨芳, 莫书银, 孙丽川, 刘文海, 戈峰. 转 *Cry1Ab/Ac* 基因水稻对稻田底栖动物群落的生态安全性. *植物保护学报*, 2015, 42(5): 715-723.

- [11] 任振涛, 沈文静, 刘标, 薛堃. 转基因玉米对田间节肢动物群落多样性的影响. 中国农业科学, 2017, 50(12): 2315-2325.
- [12] Knox O G G, Gupta V V S R, Nehl D B, Stiller W N. Constitutive expression of Cry proteins in roots and border cells of transgenic cotton. *Euphytica*, 2007, 154(1/2): 83-90.
- [13] Saxena D, Flores S, Stotzky G. Transgenic plants; Insecticidal toxin in root exudates from *Bt* corn. *Nature*, 1999, 402(6761): 480.
- [14] Saxena D, Flores S, Stotzky G. Vertical movement in soil of insecticidal Cry1Ab protein from *Bacillus thuringiensis*. *Soil Biology and Biochemistry*, 2002, 34(1): 111-120.
- [15] Chen X Y, Liu T, Li X Q, Li H X, Chen F J, Liu M Q, Whalen J K. Soil nematode community varies between rice cultivars but is not affected by transgenic Bt rice expressing *Cry1Ab* or *Cry1Ab/Cry1Ac*. *Biology and Fertility of Soils*, 2017, 53(5): 501-509.
- [16] Dang C, Lu Z B, Wang L, Chang X F, Wang F, Yao H W, Peng Y F, Stanley D, Ye G Y. Does *Bt* rice pose risks to non-target arthropods? Results of a meta-analysis in China. *Plant Biotechnology Journal*, 2017, 15(8): 1047-1053.
- [17] De Groot G A, Jagers op Akkerhuis G A J M, Dimmers W J, Charrier X, Faber J H. Biomass and diversity of soil mite functional groups respond to extensification of land management, potentially affecting soil ecosystem services. *Frontiers in Environmental Science*, 2016, 4: 15.
- [18] Hasegawa M. The relationship between the organic matter composition of a forest floor and the structure of a soil arthropod community. *European Journal of Soil Biology*, 2001, 37(4): 281-284.
- [19] Huguier P, Manier N, Owojori O J, Bauda P, Pandard P, Römbke J. The use of soil mites in ecotoxicology: a review. *Ecotoxicology*, 2015, 24(1): 1-18.
- [20] 吴廷娟, 谢小龙, 董诚明. 地黄对土壤动物数量和群落结构的影响. 核农学报, 2017, 31(11): 2273-2278.
- [21] 高梅香, 刘冬, 张雪萍, 吴东辉. 三江平原农田地表和地下土壤螨类丰富度与环境因子的空间关联性. 生态学报, 2016, 36(6): 1782-1792.
- [22] 白耀宇, 庞帅, 李石力, 丁伟. 烟草青枯病危害对烟株根际土壤螨类和弹尾虫发生的影响. 西南大学学报: 自然科学版, 2015, 37(6): 1-6.
- [23] Chen G D, Zhu W, Li M D. A preliminary study on the biological monitoring for soil pollution by oribatid mite population. *China Environmental Sciences*, 1991, 11(2): 100-104.
- [24] Al-Deeb M A, Wilde G E, Blair J M, Todd T C. Effect of *Bt* corn for corn rootworm control on nontarget soil microarthropods and nematodes. *Environmental Entomology*, 2003, 32(4): 859-865.
- [25] Yin W Y, Hu S H, Shen Y F. Pictorial keys to soil animals of China. Beijing: Science Press, 1998.
- [26] 殷秀琴, 王海霞, 周道玮. 松嫩草原区不同农业生态系统土壤动物群落特征. 生态学报, 2003, 23(6): 1071-1078.
- [27] 陈浒, 金道超, 张燕. 喀斯特小流域栓皮栎林土壤螨类群落结构特征. 应用生态学报, 2018, 29(5): 1667-1676.
- [28] Guo J F, He K L, Bai S X, Zhang T T, Liu Y J, Wang F X, Wang Z Y. Effects of transgenic *cry1Ie* maize on non-lepidopteran pest abundance, diversity and community composition. *Transgenic Research*, 2016, 25(6): 761-772.
- [29] Liu Y B, Jiang W X, Liang Y Y, Zhao C Y, Li J S. No effect of *Bt*-transgenic rice litter on the meiobenthos community in field ditches. *Pest Management Science*, 2017, 73(6): 1213-1219.
- [30] Hoffmann D, Schausberger P. Plant-mediated aboveground-belowground interactions: the spider mite perspective. *Acarologia*, 2012, 52(1): 17-27.
- [31] 游红涛. 农药污染对土壤微生物多样性影响研究综述. 安徽农学通报, 2009, 15(9): 81-82.
- [32] 白耀宇, 蒋明星, 程家安, 沈慧梅, 杨璞, 陈正贤, 姜永厚, 舒庆尧. 转 *Bt* 基因水稻 *Cry1Ab* 杀虫蛋白在水稻土中的降解. 中国水稻科学, 2004, 18(3): 255-261.
- [33] 祝向钰, 李志毅, 常亮, 袁一扬, 戈峰, 吴刚, 陈法军. 转 *Bt* 水稻土壤跳虫群落组成及其数量变化. 生态学报, 2012, 32(11): 3546-3554.