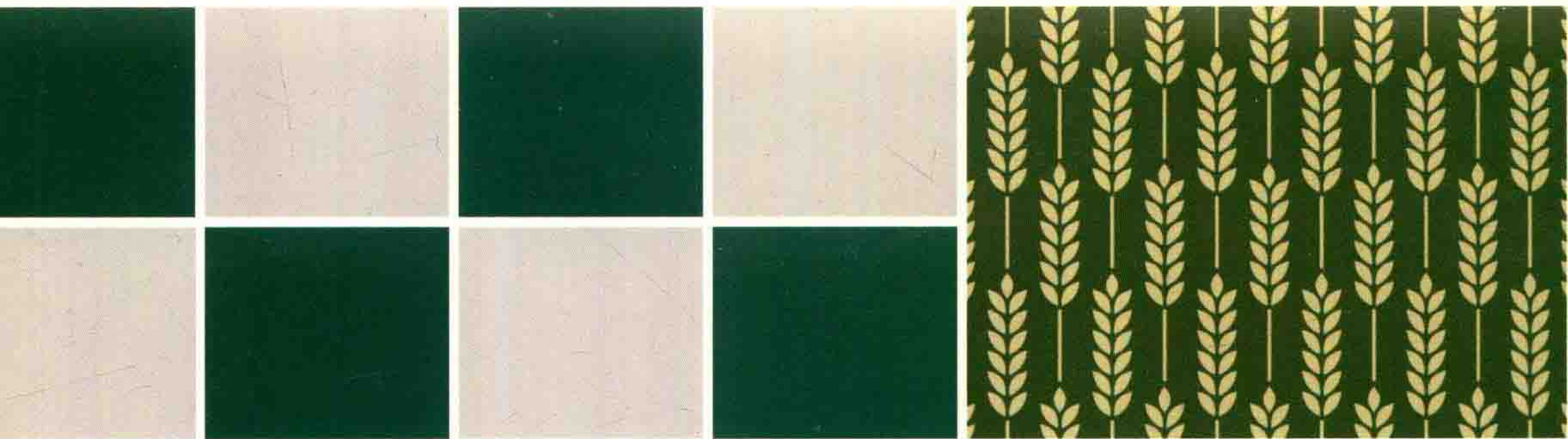


ZHUAN *Bt* JIYIN ZUOWU
DUI SHENGWU DUOYANGXING YINGXIANG DE YANJIU



转 *Bt* 基因作物 对生物多样性影响的研究

刘 标 王永模 等 编著

中国环境出版集团

环保公益性行业科研专项经费项目系列丛书

转 *Bt* 基因作物对生物多样性影响的研究

刘 标 王永模 等 编著

中国环境出版集团 · 北京

图书在版编目 (CIP) 数据

转 Bt 基因作物对生物多样性影响的研究 / 刘标等编著. —北京: 中国环境出版集团, 2018. 4

(环保公益性行业科研专项经费项目系列丛书)

ISBN 978-7-5111-3541-4

I. ①转… II. ①刘… III. ①转基因植物 - 作物 - 影响 - 生物多样性 - 研究
IV. ① S33② Q16

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2018) 第 033501 号

出 版 人 武德凯
责任编辑 宋慧敏
责任校对 任 丽
封面设计 宋 瑞

出版发行 中国环境出版集团
(100062 北京市东城区广渠门内大街 16 号)
网 址: <http://www.cesp.com.cn>
电子邮箱: bjgl@cesp.com.cn
联系电话: 010-67112765 (编辑管理部)
010-67112738 (环境科学分社)
发行热线: 010-67125803, 010-67113405 (传真)

印 刷 北京中科印刷有限公司
经 销 各地新华书店
版 次 2018 年 4 月第 1 版
印 次 2018 年 4 月第 1 次印刷
开 本 787 × 1092 1/16
印 张 16.5
字 数 368 千字
定 价 55.00 元

【版权所有。未经许可, 请勿翻印、转载, 违者必究。】
如有缺页、破损、倒装等印装质量问题, 请寄回本社更换

《环保公益性行业科研专项经费项目系列丛书》

编委会

顾问 黄润秋

组长 邹首民

副组长 王开宇

成员 禹军 陈胜 刘海波

《转 Bt 基因作物对生物多样性影响的研究》

编委会

主 编 刘 标 (环境保护部南京环境科学研究所)
王永模 (华中农业大学)

副主编 赵冬晓 (江苏省农业科学院)
魏 伟 (中国科学院植物研究所)
薛 塋 (中央民族大学)
韩 娟 (农业部食物与营养发展研究所)
齐谢敏 (中国人民解放军南京总医院)

成员(按汉语拼音排序)

曹 迪 (中国科学院植物研究所)
方志翔 (环境保护部南京环境科学研究所)
高 浩 (华中农业大学)
李广胜 (华中农业大学)
任振涛 (中央民族大学)
沈文静 (环境保护部南京环境科学研究所)
宋沁馨 (中国药科大学)
唐治喜 (中国科学院植物研究所)
张 莉 (环境保护部南京环境科学研究所)
周国华 (中国人民解放军南京总医院)
朱 敏 (华中农业大学)
邹秉杰 (中国人民解放军南京总医院)

序 言

目前，全球性和区域性环境问题不断加剧，已经成为限制各国经济社会发展的主要因素，解决环境问题的需求十分迫切。环境问题也是我国经济社会发展面临的困难之一，特别是在我国快速工业化、城镇化进程中，这个问题变得更加突出。党中央、国务院高度重视环境保护工作，积极推动我国生态文明建设进程。党的十八大以来，按照“五位一体”总体布局、“四个全面”战略布局以及“五大发展”理念，党中央、国务院把生态文明建设和环境保护摆在更加重要的战略地位，先后出台了《环境保护法》《关于加快推进生态文明建设的意见》《生态文明体制改革总体方案》《大气污染防治行动计划》《水污染防治行动计划》《土壤污染防治行动计划》等一批法律法规和政策文件，我国环境治理力度前所未有，环境保护工作和生态文明建设的进程明显加快，环境质量有所改善。

在党中央、国务院的坚强领导下，环境问题全社会共治的局面正在逐步形成，环境管理正在走向系统化、科学化、法治化、精细化和信息化。科技是解决环境问题的利器，科技创新和科技进步是提升环境管理系统化、科学化、法治化、精细化和信息化的基础，必须加快建立持续改善环境质量的科技支撑体系，加快建立科学有效防控人群健康和环境风险的科技基础体系，建立开拓进取、充满活力的环保科技创新体系。

“十一五”以来，中央财政加大对环保科技的投入，先后启动实施水体污染控制与治理科技重大专项、清洁空气研究计划、蓝天科技工程专项等专项，同时设立了环保公益性行业科研专项。根据财政部、科技部的总体部署，环保公益性行业科研专项紧密围绕《国家中长期科学和技术发展规划纲要（2006—2020年）》《国家创新驱动发展战略纲要》《国家科技创新规划》和《国家环境保护科技发展规划》，立足环境管理中的科技需求，积极开展应急性、培育性、基础性科学研究。“十一五”以来，环境保护部组织实施了公益性行业科研专项项目479项，涉及大气、水、生态、土壤、固废、化学品、核与辐射等领域，共有包括中央级科研院所、高等院校、地方环保科研单位和企业等几百家单位参与，逐步形成了优势互补、团结协作、良性竞争、共同发展的环保科技“统一战线”。目前，专项取得了重要研究成果，已验收的项目中，共提交各类标准、技术规范1232项，各类政策建议与咨询报告592项，授权专利626项，出版专著367余部，专项研究成果在各级环保部门中得到较好的应用，为解决我国环境问题和提升环境管理水平提供了重要的科技支撑。

为广泛共享环保公益性行业科研专项项目研究成果，及时总结项目组织管理经验，

环境保护部科技标准司组织出版环保公益性行业科研专项经费项目系列丛书。该丛书汇集了一批专项研究的代表性成果，具有较强的学术性和实用性，可以说是环境领域不可多得的资料文献。丛书的组织出版，在科技管理上也是一次很好的尝试，我们希望通过这一尝试，能够进一步活跃环保科技的学术氛围，促进科技成果的转化与应用，不断提高环境治理能力现代化水平，为持续改善我国环境质量提供强有力的科技支撑。

中华人民共和国环境保护部副部长
黄润秋

前言

1994年,美国 Calgene 公司研发的延熟保鲜番茄 Flavr Savr 获准在美国上市,这是世界上第一种进入商业化应用的转基因作物。转基因技术被誉为有史以来应用速度最快的技术之一,目前其应用范围涵盖农业、生物医药、环保、能源等诸多领域,已显示出巨大的经济、社会和生态效益。根据国际农业生物技术应用服务组织 (ISAAA) 的数据,在 1996—2016 年的 21 年间,以抗虫转 *Bt* (*Bacillus thuringiensis*, 苏云金杆菌) 基因作物和耐除草剂转 *EPSPS* 基因作物为代表的全球转基因作物的商业种植面积从 170 万 hm^2 增长到 1.851 亿 hm^2 , 实现了 110 倍的增长。1996—2015 年间,转基因作物不仅使全球的作物产值增加了 1 678 亿美元,而且通过降低化学杀虫剂和除草剂的用量保护了环境和人体健康。

然而,转基因作物也可能产生环境和人体健康等方面的风险。转基因作物的环境安全问题主要包括基因漂移及其生态效应、对生物多样性的影响、转基因植物的杂草化和靶标生物的抗性进化等,对这些转基因生物安全问题进行科学的评价和研究,并通过制定法律法规对转基因生物进行安全管理已经成为世界各国的通行做法。世界各国的科学工作者已经在这些领域开展了大量的研究和评价工作,积累了丰富的科学数据和资料。本书的主要内容是在环保公益性行业科研专项等课题的支持下开展的转 *Bt* 基因作物(水稻、棉花、油菜、玉米)对生物多样性影响方面的部分研究结果,希望能够对我国转 *Bt* 基因作物的环境安全管理提供科学的数据和技术支撑。

转 *Bt* 基因作物主要通过其表达的 *Bt* 蛋白对生物多样性产生潜在影响。转 *Bt* 基因作物在生长过程中会在其组织器官中持续表达外源 *Bt* 蛋白,或者通过花粉介导的基因漂移使 *Bt* 基因转移至近缘种中表达。外源 *Bt* 蛋白可能对直接或者间接取食转 *Bt* 基因作物的生物产生潜在影响,也可能通过根系分泌、作物残体进入土壤和水体生态系统,进而对土壤和水生生物产生潜在影响,这是转 *Bt* 基因作物可能对生物多样性产生影响的主要途径。根据这个思路,本书分为两部分,第一部分(第 1 章和第 2 章)内容是 *Bt* 基因在基因漂移的受体植物中的表达规律和外源 *Bt* 蛋白在土壤和水生生态系统中的残留动态,试图阐明外源 *Bt* 蛋白的表达以及在土壤和水生生态系统中的变化规律;在此基础上,本书第二部分(第 3~8 章)介绍了转 *Bt* 基因作物对不同层次的生物类群(如土壤真菌、纤毛虫、草履虫、大型溞、弹尾虫、棉铃虫和节肢动物群落)影响的研究结果。这些研究结果真实客观地回答了以上转 *Bt* 基因作物的部分环境安全问题。

尽管转基因生物自生产应用以来已经产生了很大的经济和社会效益,转基因产品已

经以各种形式进入了我们的日常生活，但是，目前世界各国关于转基因产品安全性的争论依然广泛存在，因为转基因生物安全问题不仅仅是环境安全、食品安全问题，也涉及各国的经济利益以及不同人群的信仰和价值观等。公众对转基因生物及其产品安全性的质疑，一度成为制约我国转基因技术产业发展的重要因素。作为转基因生物安全领域的科研工作者，我们的职责是以科学的态度和方法开展转基因生物安全方面的研究，向社会提供客观、科学的数据和报告。我们认为回答公众对转基因生物安全性的质疑最终还是应该依靠科学研究和科普宣传，这也是我们出版本书的最主要目的。

本课题在立项和研究过程中得到了环境保护部科技标准司、自然生态保护司等有关部门及其领导的大力支持，课题实施过程中也得到了环境保护部南京环境科学研究所有关领导的鼓励和支持，在此一并表示衷心感谢。

编著者

2018 年 3 月

目 录

第 1 章 转 <i>Bt</i> 基因水稻外源蛋白在土壤和水生环境中的残留和去向	1
1.1 转 <i>Bt</i> 基因稻田中外源蛋白在土壤和水体中的残留与扩散	1
1.1.1 引言	1
1.1.2 材料与方法	3
1.1.3 结果与分析	6
1.1.4 结论与讨论	10
1.2 转 <i>Bt</i> 基因水稻田周边土壤及水体外源蛋白残留研究	14
1.2.1 引言	14
1.2.2 材料与方法	15
1.2.3 结果与分析	19
1.2.4 讨论	22
1.3 后茬作物对 <i>Bt</i> 稻释放在环境中的外源 <i>Bt</i> 蛋白的吸收研究	24
1.3.1 引言	24
1.3.2 材料与方法	25
1.3.3 结果与分析	27
1.3.4 结论与讨论	31
参考文献	32
第 2 章 转 <i>Bt</i> 基因油菜与野芥菜基因渐渗后代中 <i>Bt</i> 蛋白的表达及其杀虫活性	39
2.1 引言	39
2.2 材料与方法	40
2.2.1 <i>Bt</i> 基因渐渗及其表达	40
2.2.2 渐渗后代的杀虫活性	41
2.3 结果	41
2.3.1 杂交种与回交后代的结荚率与种子产量	41
2.3.2 转基因在回交后代中的分离	42
2.3.3 回交后代 <i>Bt</i> 蛋白表达含量	43
2.3.4 转基因回交后代的杀虫活性	43

2.4	讨论	45
	参考文献	48
第3章	棉铃虫对转 <i>Bt</i> 基因棉的行为反应	52
3.1	棉铃虫成虫对转 <i>Bt</i> 基因棉的行为反应	52
3.1.1	引言	52
3.1.2	材料与方法	53
3.1.3	结果与分析	54
3.1.4	结论与讨论	55
3.2	棉铃虫幼虫对转 <i>Bt</i> 基因棉的行为反应	57
3.2.1	引言	57
3.2.2	材料与方法	58
3.2.3	结果与分析	60
3.2.4	结论与讨论	62
	参考文献	64
第4章	转 <i>Bt</i> 基因水稻对水生动物多样性的影响	69
4.1	转 <i>Bt</i> 基因水稻对大型蚤的生态毒性	69
4.1.1	引言	69
4.1.2	材料与方法	69
4.1.3	结果与分析	73
4.1.4	讨论	77
4.2	转 <i>Bt</i> 基因水稻对稻田主要水生浮游动物多样性的影响	78
4.2.1	引言	78
4.2.2	材料和方法	79
4.2.3	结果与分析	82
4.2.4	讨论	85
4.3	模拟商业种植条件下 <i>Bt</i> 稻田浮游动物多样性的影响	88
4.3.1	引言	88
4.3.2	材料与方法	89
4.3.3	结果与分析	92
4.3.4	讨论	96
	参考文献	98
第5章	<i>Bt</i> 棉和 <i>Bt</i> 稻对土壤弹尾虫和纤毛虫多样性及其生态功能的影响	107
5.1	<i>Bt</i> 棉对土壤弹尾虫和纤毛虫种群数量和多样性的影响	107

5.1.1	引言	107
5.1.2	材料与方法	108
5.1.3	结果与分析	110
5.1.4	讨论	115
5.2	<i>Bt</i> 棉与 <i>Bt</i> 稻秸秆在土壤中的降解特性研究	116
5.2.1	引言	116
5.2.2	材料与方法	118
5.2.3	结果与分析	119
5.2.4	结论与讨论	127
	参考文献	129
第 6 章	转 <i>Bt</i> 基因棉花对土壤丝状真菌影响的监测	133
6.1	无标记高通量核酸序列分析模板质量评价标准体系建立及文库构建 初步研究	135
6.1.1	实验材料	136
6.1.2	实验方法	136
6.1.3	结果与分析	142
6.1.4	结论	154
6.2	无标记高通量核酸序列分析技术在转基因棉敏感标志物筛选中的应用 评价	155
6.2.1	实验材料	156
6.2.2	实验方法	157
6.2.3	结果与分析	162
6.2.4	结论与讨论	188
	参考文献	190
第 7 章	转 <i>Bt</i> 基因水稻对根际微生物多样性和土壤酶活性的影响	193
7.1	转 <i>Bt</i> 基因水稻对根际真菌、细菌和放线菌丰度的影响	193
7.1.1	引言	193
7.1.2	材料与方法	194
7.1.3	结果与分析	196
7.1.4	结论与讨论	200
7.2	转 <i>Bt</i> 基因水稻对根际真菌、细菌和放线菌多样性的影响	201
7.2.1	引言	201
7.2.2	材料与方法	202

7.2.3	结果与分析	204
7.2.4	结论与讨论	207
7.3	转 <i>Bt</i> 基因水稻根际分泌物对土壤酶活性的影响	208
7.3.1	引言	208
7.3.2	材料与方法	209
7.3.3	结果与分析	213
7.3.4	讨论	217
7.4	转 <i>Bt</i> 基因水稻对土壤理化性质的影响	218
7.4.1	引言	218
7.4.2	材料与方法	219
7.4.3	结果与分析	220
7.4.4	结论与讨论	225
	参考文献	226

第8章	转基因抗虫 (<i>Bt cry1Ab</i>) 抗草甘膦 (<i>EPSPS</i>) 玉米 DBN9936 对田间节肢动物生物多样性的影响	231
8.1	抗虫转基因作物的研究和应用现状	231
8.1.1	抗虫基因及其表达产物	231
8.1.2	抗虫转基因作物对非靶标动物的影响	232
8.1.3	研究抗虫转基因玉米对田间节肢动物多样性影响的意义	234
8.2	研究材料与方法	235
8.2.1	供试材料	235
8.2.2	试验处理及小区设计	235
8.2.3	试验方法	235
8.2.4	数据分析	236
8.3	研究结果	236
8.3.1	田间节肢动物主要类群和功能群	236
8.3.2	节肢动物丰富度动态	238
8.3.3	节肢动物群落多样性	239
8.3.4	节肢动物群落优势集中性	240
8.3.5	节肢动物群落均匀性	240
8.3.6	节肢动物群落相似性	241
8.3.7	玉米穗期钻蛀类害虫危害评价	242
8.4	讨论和结论	244
	参考文献	245

第1章 转 *Bt* 基因水稻外源蛋白在土壤和水生环境中的残留和去向

1.1 转 *Bt* 基因稻田中外源蛋白在土壤和水体中的残留与扩散

1.1.1 引言

转基因工程的发展使作物自身表达某些外源基因变成可能。苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*, *Bt*) 是一种广泛分布的土壤细菌 (Martin and Traver, 1989), 含有编码对鳞翅目和鞘翅目等昆虫幼虫有毒害作用的晶体蛋白的基因 (Crickmore et al., 1998; Schnepf et al., 1998)。将晶体蛋白基因导入植物, 使植物自身连续表达 *Bt* 蛋白可减少害虫管理的麻烦 (Hoffmann et al., 1992; Bolin et al., 1996)。尽管 *Bt* 活菌制剂作为一种生物农药已被长期使用 (Walker et al., 2003), 但商业化种植转 *Bt* 基因作物的潜在环境风险仍然引起广泛关注 (Rissler and Mellon, 1996; Stotzky, 2000; Motavalli et al., 2004; Turrini et al., 2004)。商业化种植之前乃至商业化种植之后, 需要根据具体情况进行转基因作物的环境风险评估 (Andow et al., 1987), 这些风险评估主要侧重于外源基因漂移 (Snow and Palma, 1997; Quist and Chapela, 2001)、对非靶标生物的影响 (Hilbeck et al., 1998; Losey et al., 1999)、靶标害虫的抗性进化 (Alstad and Andow, 1995; Bates et al., 2005; Meihls et al., 2008) 以及由于耕作措施改变而产生的风险等 (Krebs et al., 1999; Robinson and Sutherland, 2002)。

Bt 作物中表达的 *Bt* 外源蛋白可能通过根系分泌物、收获后的秸秆残体, 或通过开花期间的花粉脱落进入土壤生态系统 (Losey et al., 1999; Saxena et al., 1999; Saxena et al., 2002a; Saxena and Stotzky, 2001; Zwahlen et al., 2003; Baumgarte and Tebbe, 2005)。有研究表明, *Cry1Ab* 蛋白可从无菌水或无菌土壤培养的转 *Bt* 基因玉米的根系被分泌出来进入环境中 (Saxena et al., 1999; Saxena and Stotzky, 2000; Saxena et al., 2002a), 并且使用烟草天蛾幼虫 (*Manduca sexta*) 的生物测定证实这些被分泌出来的 *Bt* 蛋白具有活性 (Saxena et al., 1999)。在对 *Bt* 玉米 (MON810) 进行的为期 3 年的野外研究中, *Cry1Ab* 蛋白在大田土壤中的含量总体上比根际土壤中的低, 这表明通过根系分泌物产生的 *Cry1Ab* 蛋白会导致土壤中 *Bt* 蛋白分布的差异 (Baumgarte and Tebbe, 2005)。通过免疫学方法和生物测定方法检测 *Bt* 外源蛋白在土壤和水培溶液中的含量, 发现生长过 *Bt* 玉米 (*cry1Ab*)、*Bt* 稻 (*cry1Ab*)、*Bt* 马铃薯 (*cry3A*) 培养液中有 *Bt* 蛋白的存在,

但在种植 *Bt* 油菜 (*cry1Ac*)、*Bt* 棉 (*cry1Ac*) 和 *Bt* 烟草 (*cry1Ac*) 的土壤中没有检测到 *Bt* 蛋白 (Saxena et al., 2004)。在一些 *Bt* 作物中, *Bt* 外源蛋白在根系分泌物中释放出来的原因尚不清楚, 但现有的研究表明根系分泌物中释放的 *Bt* 外源蛋白的量需要根据具体的转基因事件和晶体蛋白基因的种类来确定 (Saxena et al., 2004)。收获后残留在地上或地下的作物残体的降解是 *Bt* 外源蛋白进入土壤生态系统的另一个重要途径。通过比较收获后田间各种植物组织发现, *Bt* 玉米 (MON810) 的叶片材料仅含有 0.2% 的初始外源蛋白浓度, 而根部材料仍含有初始浓度的 12% (Baumgarte and Tebbe, 2005)。不同组织之间的剩余外源蛋白量的差异是因为叶片与根部组织相比有更高的降解速度, 因此收获后埋藏在地下的 *Bt* 作物根系可能是土壤中 *Bt* 外源蛋白的主要储集层。

许多研究评估了 *Bt* 作物或苏云金芽孢杆菌的各个亚种在土壤中产生的 *Bt* 外源蛋白的持久性以及活性的降解动态。苏云金芽孢杆菌产生的杀虫晶体蛋白在黏土颗粒和腐殖酸上快速被吸附而形成紧密结合体, 这个过程不改变 *Bt* 外源蛋白的空间结构 (Tapp et al., 1994; Crecchio and Stotzky, 1998), 结合态的外源蛋白保留其杀虫活性, 并可以大大减缓微生物对外源蛋白的降解 (Tapp and Stotzky, 1995; Koskella and Stotzky, 1997; Crecchio and Stotzky, 1998; Crecchio and Stotzky, 2001)。在使用烟草天蛾 (*M. sexta*) 的生物测定中得出 *Bt* 外源蛋白在某些类型的土壤中保持杀幼虫活性可长达 234 天 (Tapp and Stotzky, 1998)。在大田条件下的研究表明, 在连续 4 年种植 *Bt* 玉米的土壤中可以检测到 Cry1Ab 蛋白, 甚至玉米收获数月后仍然能够检测出残体中存在外源蛋白 (Hopkins and Gregorich, 2003)。在 5 个不同的降解模拟试验中, 将含有 *Bt* 外源蛋白 (Cry1Ab 和 Cry1Ac) 的转基因棉花叶子添加到土壤中, 140 多天后在土壤中可检测到 *Bt* 外源蛋白 (Palm et al., 1996)。Zwahlen 等 (2003) 研究了 *Bt* 玉米组织中的 Cry1Ab 蛋白降解, 转基因玉米组织埋藏于土壤 200 多天后可检测到 Cry1Ab 蛋白。通过异位和原位试验, Saxena 和 Stotzky (2001) 报道, 从根系分泌物释放的外源蛋白以及 *Bt* 玉米组织释放的外源蛋白迅速被土壤吸附, 使杀虫活性至少保持 180 天。然而, 一些研究表明, *Bt* 外源蛋白在种植 *Bt* 作物后不会持续存在于土壤中, 在 *Bt* 玉米连续种植 3 年后, 在生长期和收获后 6 周收集土壤样品, 没有检测到 Cry1Ab 蛋白在土壤中长期留存和积累的证据 (Dubelman et al., 2005)。Margarit 等 (2008) 报道, 从转基因玉米根部渗出的 Cry1Ab 蛋白不会积累在土壤中。

Bt 稻是经过遗传修饰表达来自苏云金芽孢杆菌晶体蛋白基因的水稻, 能产生杀死鳞翅目害虫的外源蛋白, 这些鳞翅目害虫包括三化螟 (*Scirpophaga incertulas*)、二化螟 (*Chilo suppressalis*) 和稻纵卷叶螟 (*Cnaphalocrocis medinalis*) 等 (Wang et al., 2010)。许多公司和科研单位正在开发高效的转基因抗虫水稻, 1993 年以来已经开发出数十种对鳞翅目害虫具有较高抗性的 *Bt* 水稻品系 (Chen et al., 2006; Cohen et al., 2008)。2009 年 8 月, 农业部为两个转基因水稻品系 *Bt*-汕优 63 和 *Bt*-明恢 63 颁发了安全证书 (Lu, 2010; Jia, 2010), 这两个品系为本研究采用的品种材料, 它们都含有融合基因 *cry1Ab/1Ac*。*Bt*-汕优 63 是 *Bt*-明恢 63 与珍汕 97A 的杂交品系, 由于杂种优势, *Bt*-汕优 63 的田间长势更

好,产量高于 *Bt*-明恢 63,安全证书有效期至 2014 年 8 月,允许两个品系在湖北(中国中部)种植。目前为止,还没有关于这两个 *Bt* 稻品系从根系分泌外源蛋白以及外源蛋白在土壤中的持久性的研究,我们甚至不知道这两个 *Bt* 稻品系是否会从根系分泌 *Bt* 外源蛋白。水稻生长与其他旱地作物不同,在大多数生育阶段水稻需要灌溉,并在田间保持水层(丁颖,1961)。如果如 Saxena 等(2002b)的预测“*Bt* 外源蛋白在土壤中的积累和持留可能会随地表水水平移动到相邻的区域或渗透到地下水层中”,那么 *Bt* 稻的环境风险更值得引起注意。本研究旨在探讨 *Bt* 外源蛋白在实验室和田间条件下是否会从 *Bt* 稻根系分泌物中被释放出来,并测定 *Bt* 外源蛋白在田间是否存在水平或垂直移动,以及 *Bt* 外源蛋白在根际土壤中的持留时间。因为水稻幼苗必须从种苗床上拔下来,因此移栽水稻常常导致根系产生伤口,因此我们还设计了一个实验来研究根系伤口是否会增加 *Bt* 水稻向环境释放外源蛋白的量。本项研究工作可为 *Bt* 水稻的商业释放提供参考,其结果也可作为评价 *Bt* 水稻对土壤非靶标生物的风险提供基础数据。

1.1.2 材料与方法

1.1.2.1 供试水稻品种

Bt 水稻品种为华中农业大学的 *Bt*-明恢 63 和 *Bt*-汕优 63,以该转基因亲本非 *Bt*-明恢 63 和非 *Bt*-汕优 63 为对照。*Bt*-汕优 63 是汕优 63 的转基因改良品种,其母本为珍汕 97A,父本为 *Bt*-明恢 63(华恢 1 号,又称 TT51-1)。*Bt*-明恢 63 是以明恢 63 为受体品种,导入外源抗虫基因 *cry1Ab/1Ac* 形成的转基因品种。所导入的外源抗虫基因是由我国科学家人工改造合成的苏云金芽孢杆菌(*Bt*)杀虫蛋白融合基因,其表达产物可以专一、高效地控制水稻二化螟、三化螟和稻纵卷叶螟等水稻鳞翅目害虫。外源抗虫基因通过基因枪介导共转化法导入明恢 63 受体内,经多代选择,获得抗虫基因可以稳定遗传表达的“华恢 1 号”。华恢 1 号和 *Bt*-汕优 63 这两个品种的育成,其关键的技术环节是将明恢 63 通过转基因育种方法变成了抗虫的明恢 63 即华恢 1 号。华恢 1 号育成后,通过与珍汕 97A 配组,形成了 *Bt*-汕优 63(Tu et al., 2000)。

1.1.2.2 试验田的选择

试验田在华中农业大学校内试验基地。试验田具有典型性,即自然水流和灌溉水流可以从试验田块流向低地势的田块,试验田上游有水渠,上游约 100 m 处的田块以往连续 3 年种植 *Bt* 水稻,下游约 100 m 处的田块种植常规玉米,约 500 m 处有鱼塘。试验田面积约为 1 500 m²。如图 1-1 所示,水流可以从灌溉水源源头流向 *Bt* 稻田,下游的非 *Bt* 稻田分为两部分,其中一部分直接由水源灌溉,另一部分由 *Bt* 稻田的过水灌溉。为使小区之间不相互串流,小区之间筑 50 cm 高的硬化田埂。

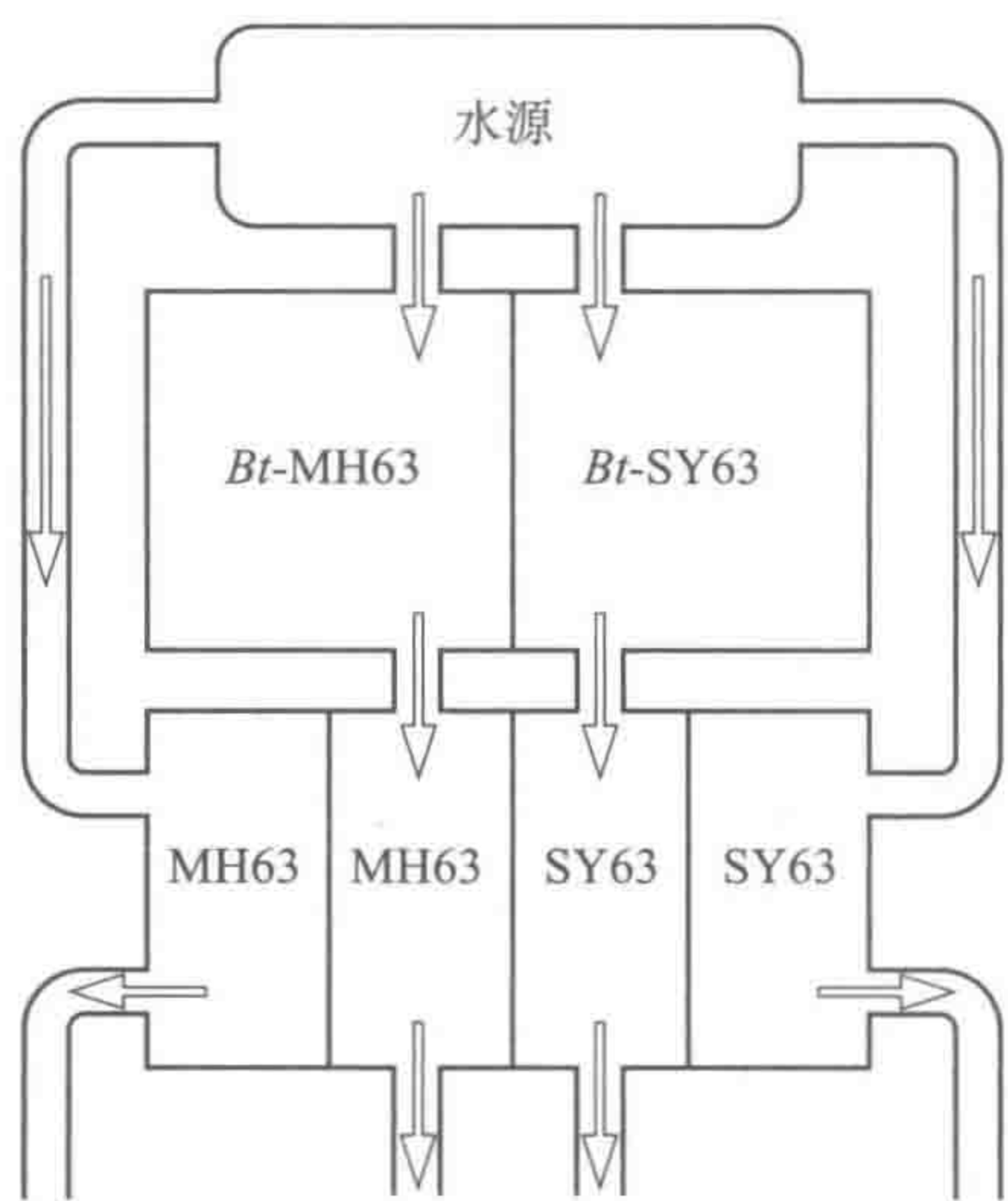


图 1-1 试验田的布置图

1. 1. 2. 3 试验田管理

Bt 处理和对照田管理按照常规进行，实施秸秆还田。试验时间为 2 年。湿润育秧，人工单本移栽，株距为 18 cm（列间距）× 20 cm（行间距），人工中耕除草。2009 年试验于 5 月 6 日播种，5 月 31 日移栽，秧龄 25 天。8 月 2 日扬花，8 月 23 日乳熟，9 月 12 日收割。2010 年试验于 5 月 18 日播种，6 月 12 日移栽，秧龄 25 天。8 月 15 日扬花，9 月 5 日乳熟，10 月 10 日收割。相同的田块连续 2 年种植相同的品种（*Bt* 或非 *Bt*）。试验期中全程不施用化学农药。

1. 1. 2. 4 土样和水样采样

分别于分蘖、拔节和开花期采集田间土样，每个小区采 5 份；小心拔起一丛水稻，用药匙刮取根部的泥土，用封口袋采集各处理土样，拿回室内，准确称取每份样品 0.5 g，转入到 1.5 mL 离心管中，加 500 μL 抽提缓冲液，然后将离心管置于振荡器上剧烈振荡数秒，进行抽提；离心，取上清液，24 h 内待测。分别于分蘖、拔节和开花期采集田间土样，用 50 mL 离心管直接采集田间水样，每个小区 5 份，带回室内备用，并在 24 h 内处理完毕。在收获期采集不同深度的土壤样本测定 *Bt* 蛋白的垂直扩散深度，水稻收获后在小区内挖土壤剖面，从表土开始每隔 10 采集一层土壤，采到 90 cm 深。从收获期开始每隔 1 个月采集 1 次根围土，测定土壤中外源蛋白持留时间。

1. 1. 2. 5 水培液中外源 *Bt* 蛋白测定

室内培养 *Bt* 稻，培养溶液为 Yoshida 氏水稻培养液（Yoshida et al., 1976），先选择饱满的水稻种子，表面用强氯精消毒后在无菌纸上催芽，3 天后在 200 mL 烧杯中培养，