

•研究报告•

华东三省转 Bt 基因棉花种植对边际水体中Cry1Ab/c蛋白残留的影响

刘 华^{1,2} 常晓蕾³ 蒋 玮^{2,4} 白 蓝^{1,4} 郑曙峰⁵ 王金斌^{1,4}
王 维⁵ 潘爱虎^{1,4} 王荣谈⁶ 唐雪明^{1,2,4*}

1 (农业部转基因植物环境安全监督检验检疫(上海)中心, 上海 201106)

2 (上海市农业科学院生物技术研究所, 上海 201106)

3 (上海海洋大学, 上海 201306)

4 (上海市农业遗传育种重点实验室, 上海 201106)

5 (安徽省农业科学院棉花研究所, 安徽安庆 246003)

6 (上海瑞丰农业科技有限公司, 上海 201106)

摘要: 为调查转基因棉花种植地区边际水体中的Cry1Ab/c蛋白残留情况, 在华东地区的山东、江苏、安徽三省棉田设置采样点, 连续3年在棉花的花铃期和收获季节, 对棉区地块内部及周围边际水体随机采样, 进行去杂及纯化处理后, 利用ELISA (酶联免疫吸附测定)方法检测水样中的Cry1Ab/c蛋白含量。结果表明: (1)在花铃期和收获季前后两周, 分别在5个布控点边际水体中检出Cry1Ab/c蛋白, 其中1个布控点阳性蛋白残留浓度最高达到0.4 ppb, 另外4个布控点检测出的阳性蛋白量均在0.04 ppb以下; (2)距离棉田越近, 蛋白检出阳性率越高, 其中棉田内水渠阳性率为13.3%; (3)连续种植时间超过7年的田地周围水体中蛋白阳性率为12.4%。在所有取样时间点中, 与花铃期相比, 收获季更容易检测到阳性结果。这表明在转基因棉花产区, 应在收获季进行适当的指导和监控, 以预防和降低转基因棉花中Cry1Ab/c蛋白对边际水体的潜在影响。

关键词: 转基因棉花; 酶联免疫吸附测定(ELISA); Cry1Ab/c蛋白含量

Effect of Cry1Ab/c protein residues from Bt cotton-producing areas in regions with marginal water in three provinces in eastern China

Hua Liu^{1,2}, Xiaolei Chang³, Wei Jiang^{2,4}, Lan Bai^{1,4}, Shufeng Zheng⁵, Jinbin Wang^{1,4}, Wei Wang⁵, Aihu Pan^{1,4}, Rongtan Wang⁶, Xueming Tang^{1,2,4*}

1 Supervision, Inspection and Test Center for Environmental Safety of Genetically Modified Crops of Ministry of Agriculture, Shanghai 201106

2 Biotechnology Research Institute, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 201106

3 Shanghai Ocean University, Shanghai 201306

4 Key Laboratory of Agricultural Genetics and Breeding, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 201106

5 Cotton Research Institute of Anhui Academy of Agricultural Sciences (CRI, AAAS), Anqing, Anhui 246003

6 Shanghai Rui-feng Agro-Technology Company Limited, Shanghai 201106

Abstract: To investigate Cry1Ab/c protein residues in marginal water regions of transgenic cotton-producing areas, this study focused on 15 sampling points from three provinces of eastern China using random sampling. We sampled three consecutive years during the flowering and harvesting of cotton, respectively, purified Cry1Ab/c proteins in these samples were detected using the ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) method. Results showed that: (1) The highest concentration of Cry1Ab/c protein in marginal water reached 0.4 ppb at one sampling point. At the other four monitoring points, the residual concentration of Cry1Ab/c protein was less than 0.04 ppb. (2) The closer the cotton field, the higher the positive detection

收稿日期: 2016-05-20; 接受日期: 2016-08-24

基金项目: 上海市农委青年人才项目(沪农青(2016)1-15)、上海市农委重点攻关项目(2015-4-3)和科技部国际合作项目(CS06-L10)

* 通讯作者 Author for correspondence. E-mail: saas_xmtang@foxmail.com

rate, and the positive rate was 13.3% in the cotton field canals. (3) The positive protein detection rate was 12.4% in planting fields that had been planted for more than 7 years. We also found that during the harvest season the positive protein detection rate was easier to detect than during the flowering period. Our findings indicated that the *Bt* cotton-producing areas should be properly monitored during the harvest season, in order to reduce the potential impacts of Cry1Ab/c protein on the marginal water sources in transgenic cotton producing areas.

Key words: transgenic cotton; enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA); Cry1Ab/c protein residues

生物技术在农业方面的应用近20年来发展很快,其主要目标是用更少的土地生产更多的食物,缓解全球因人口增长而产生的食品短缺,同时又可以减少农药的使用。生物技术的应用为全人类带来了巨大的经济和社会效益。生物技术育种是一种经DNA重组与遗传转化或直接运载进入受体生物,经过筛选获得稳定表达的遗传工程育种方法。如在番茄(*Lycopersicon esculentum*)中植入延熟的基因,可以延长其保存时间(Thomas, 2008)。据调查,截至2015年,全球转基因作物的累计种植面积达20亿ha。在转基因作物中,抗虫转基因作物(主要是转*Bt*基因农作物)的种植比例就占15% (Clive, 2016)。随着我国新型转基因抗虫棉培育和产业化的全面推进,仅2008–2010年间就新培育了36个抗虫棉品种,累计推广1,100多万ha,实现经济效益160亿元,有效控制了棉铃虫(*Helicoverpa armigera*)的危害,彻底打破了国外抗虫棉种子公司的垄断地位。作为一种新的生物成员,转基因棉花的商业化种植对农田生态系统中生物群落的影响已引起广泛关注。长期种植转基因作物对环境安全和人类健康的影响是我们不得不面对的新问题。

有研究表明,当*Bt*蛋白进入生态环境中的量和速度超过其降解速率时,可能会产生蛋白的富集,进而对土壤和水体中的微生物及动物产生影响(樊龙江等, 2001)。Lu等(2010)针对转*Bt*基因抗虫棉开展了一项为期10年的田间实验,其结果表明,尽管转*Bt*基因棉花的种植使农药的使用量减少,但导致非靶标昆虫盲蝽蟊(*Lygus lucorum*)呈爆炸式增长。目前全球转基因棉花的累计种植面积为3亿ha,我国是转*Bt*基因抗虫棉的种植大国,仅2015年就种植了370万ha,占我国棉花种植总面积的97.3% (<http://www.isaaa.org/inbrief/default.asp>)。因此亟需研究转*Bt*基因抗虫棉对棉产区生态系统的影响。

由基因表达产物引发的土壤生物群落结构的

变化复杂,有必要对不同类型转基因作物释放后的生态效应进行长期的跟踪研究。有研究表明,导入作物中的外源基因及其表达蛋白均可通过多种途径进入土壤或边际水体中(王洪兴等, 2002)。目前已经进行商业化应用的转*Bt*基因抗虫棉所含外源杀虫基因均来自苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*, *Bt*),主要包括杀虫晶体蛋白(insecticidal crystal proteins, IPS)基因Cry1Ac、Cry1Ab、Cry2Ab以及营养期杀虫蛋白(vegetative insecticidal proteins, VIP)基因VIP3A等。其中Cry1蛋白对鳞翅目害虫有专一性; Cry2蛋白对鳞翅目和双翅目害虫有专一性;而VIP3A蛋白对棉铃虫、烟草夜蛾(*Heliothis assulta*)、红铃虫(*Pectinophora gossypiella*)等某些鳞翅目害虫有专一性(王立国等, 2014)。有研究表明,转*Bt*基因抗虫棉田土壤中的蛋白降解速率先快后慢,2个月仍有一半未降解(Head, 2002, Saxena et al, 2002a),而转*Bt*基因玉米(*Zea mays*)的根际土壤中则需7–8个月才检测不到(孙彩霞等, 2003; 邢珍娟等, 2010)。姜伟丽等(2014)对双抗棉棉田中昆虫群落多样性的季节动态研究发现,种植转基因抗虫棉对棉田内昆虫的群落结构影响较小,不会扰乱其稳定性。另外,对连续种植多年*Bt*-SY63水稻(*Oryza sativa*)的水体和土壤中的*Bt*蛋白残留动态进行监测发现,与非转基因稻田相比,其Cry1Ab/c蛋白残留量未达到显著水平($P > 0.05$),且不会造成Cry1Ab/c蛋白在稻田水体和土壤中的累积(张莉等, 2015)。Liu等(2009)用转*Bt*基因抗虫棉叶喂食蚯蚓(*Arenicola cristata*),发现蚯蚓体内并未产生急性毒性效应。

转*Bt*基因作物中的*Bt*蛋白不仅可以通过其根际分泌物、秸秆还田等方式进入土壤中,收获后堆积于农田边的作物还会被风或水流输送到周围水体中。另外,它还可通过花粉、作物残体和陆源碎屑等途径进入其邻近水域。*Bt*蛋白可溶于水中,这使邻近水域中的水生生物有接触到*Bt*蛋白的可能

(Viktorov, 2011; Carstens et al, 2012)。也有研究表明, 进入水体的*Bt*蛋白并不十分稳定, 随时间推移会很快发生降解(Prihoda & Coats, 2007; Tank et al, 2010)。现有转基因作物中的外源蛋白残留的相关研究主要集中在土壤生态系统, 对*Bt*蛋白进入河道及其边际水体的后续研究较少, 对这方面的环境风险评估也较少, 目前国内外对转基因作物的种植是否会对其边际水体造成影响还没有明确的结论。Andrew等(2009)研究表明, 在种植转基因玉米周围的沟渠及河流湖泊中, 转基因玉米副产物会增加水生昆虫的死亡率, 降低其增长率。Tank等(2010)发现, 在玉米收获6个月, 美国中西部地区的密西西比河河水中仍可检测出Cry1Ab/c蛋白残留。目前国内外还未有对转基因棉花种植地边际水体中的Cry1Ab/c蛋白含量进行连续采样及系统的研究。本文就山东、江苏、安徽3省多地的转*Bt*基因抗虫棉种植地的邻近水域进行了多年不同时空的连续采样, 对水体中*Bt*蛋白的含量进行检测分析, 拟评估Cry1Ab/c蛋白的富集效应, 探究转*Bt*基因抗虫棉对种植地边际水体生态环境的影响。

1 材料与方法

1.1 样品采集

水体样品采集于华东地区棉花主产区: 山东(5个布控点)、江苏(4个布控点)、安徽(6个布控点)的转*Bt*基因抗虫棉种植地的邻近水域, 布控点均位于棉产区中心位置(表1), 采集时间为棉花的花铃期(7月)和收获期(11月)。将每个布控点收集的水样进行编号, 并用GPS记录经纬度。共采集了2012年11月、2013年7月和11月、2014年7月和11月5个时间段的样品。样品采集原则是优先选取棉田周围自然生态系统中的水体, 若半径1 km内无水体则选择周围河道水, 均为流动水体。取样方式为: 将30 mL消毒玻璃针筒插入水体50 cm深处取活水, 收集于250 mL消毒的塑料瓶中, 密封后放在装有冰袋的塑料泡沫盒中带回实验室。采集水体样品的同时, 随机采集棉田内的棉花叶片作为ELISA (酶联免疫吸附测定, enzyme-linked immunosorbent assay)实验的对照材料。

因不同省份不同地区的水文图谱不同, 种植灌

表1 华东三省棉产区水体样品布控点具体位置及样品编号
Table 1 GPS coordinates and water sample number at cotton cultivated areas in three provinces in eastern China

棉产区 Cotton cultivated areas	经纬度 GPS coordinates	不同时间段采样编号 Sample number at different time frames				
		2012.11	2013.7	2013.11	2014.7	2014.11
山东省 Shandong Province						
东营三坝三村 Sanqingsan Village of Dongying City	37°52'48" N, 116°20'11" E	72(ABC)	80(ABC)	10(ABC)	42(ABC)	96(ABC)
德州宋楼村 Songlou Village of Dezhou City	36°54'37" N, 115°55'56" E	58(ABC)	87(ABC)	25(ABC)	43(ABC)	97(ABC)
滨州南赵村 Nanzhao Village of Binzhou City	37°41'7" N, 118°5'22" E	75(ABC)	81(ABC)	8(ABC)	46(ABC)	98(ABC)
德州陶店村 Taodian Village of Dezhou City	36°56'15" N, 115°57'24" E	73(ABC)	82(ABC)	11(ABC)	44(ABC)	99(ABC)
滨州西黄村 Xihuang Village of Binzhou City	37°52'5" N, 117°46'11" E	76(ABC)	83(ABC)	9(ABC)	45(ABC)	100(ABC)
江苏省 Jiangsu Province						
江苏省农业科学院 Jiangsu Academy of Agricultural Sciences	32°2'17" N, 118°51'50" E	52(ABC)	91(ABC)	—	41(ABC)	95(ABC)
大丰稻麦原种场 Rice and Wheat Seeds stock station of Dafeng City	33°24'09" N, 120°34'54" E	54(ABC)	24(ABC)	2(ABC)	38(ABC)	93(ABC)
泰州荻垛村 Diduo Village of Taizhou City	32°54'19" N, 120°5'39" E	68(ABC)	22(ABC)	1(ABC)	39(ABC)	92(ABC)
启东兴益村 Xingyi Village of Qidong City	31°57'5" N, 121°46'2" E	56(ABC)	21(ABC)	4(ABC)	40(ABC)	94(ABC)
安徽省 Anhui Province						
安庆棉花所 Anqing Cotton Research Institute	30°31'2" N, 117°5'19" E	51(ABC)	19(ABC)	28(ABC)	35(ABC)	103(ABC)
宿松复兴村 Fuxing Village of Susong City	29°54'58" N, 116°30'23" E	65(ABC)	20(ABC)	30(ABC)	33(ABC)	102(ABC)
望江雷池村 Leichi Village of Wangjiang City	30°9'45" N, 116°48'43" E	67(ABC)	14(ABC)	26(ABC)	34(ABC)	101(ABC)
全椒县 Quanjiao County	32°4'18" N, 118°12'12" E	49(ABC)	13(ABC)	29(ABC)	77(ABC)	106(ABC)
东至县 Dongzhi County	30°30'55" N, 117°3'45" E	48(ABC)	12(ABC)	32(ABC)	36(ABC)	105(ABC)
铜陵市 Tongling City	31°10'24" N, 117°7'48" E	50(ABC)	15(ABC)	31(ABC)	37(ABC)	107(ABC)

A、B、C分别表示同一地点采集的3个不同样品。
A, B, C represent different samples in the same place.

溉方式也不一致,故根据棉田内部及周边的具体地理位置设置了4种不同的采样地点:(1)棉田内流动水渠(距离棉田< 50 m);(2)棉田河岸流动河道(距离棉田< 100 m);(3)棉田内封闭水渠;(4)棉田附近流动河道(方圆半径< 1,000 m),以便于分析不同监测距离下Cry1Ab/c蛋白的残留情况(图1)。

1.2 实验方法

采样时间分别为花铃期和收获期的前后两周内,连续采样3年,在样品采集过程中均采用随机3点取样法。因采用针筒吸取样品,棉花植株及其碎屑均被过滤,且样品采集后又经过低速离心去除杂质,故水体中蛋白含量均为溶解的Cry1Ab/c蛋白。

1.2.1 样品前处理

(1)将采集的水体样品置于50 mL离心管中,进行4,000 rpm低速离心,取其上清液。若样品含有大量杂质,为防止搜集*Bt*蛋白时堵塞超滤膜,则需多次离心,直至肉眼看不见杂质为止。

(2)取上清液25 mL到截留量为50 kD的超滤管中(Cry1Ab/c蛋白的分子量在130 kD左右),放置于高速离心机(HitachiCR22G,日立公司,日本)中,6,850 rpm离心20 min,重复4次,将浓缩的蛋白液体1 mL置于灭菌的1.5 mL离心管中,于4℃保存备用。

(3)将采集的整片棉花叶片用打孔器取样,孔面积5–10 mm²,取好分别放入1.5 mL的Eppendorf管中捣碎,加入250 μL的样品提取液(试剂盒内提供),震荡混匀5 min,4,000 rpm离心3 min,取100 μL上清液作为阳性对照备用。

1.2.2 ELISA检测

采用EnviroLogix试剂盒检测所有样品,具体步骤如下:(1)将所有试剂放置于室温(20–25℃)中平衡回温30 min以上,混匀;(2)将样品、阳性品及标准品分别进行编号,并记录标准孔和各个样品孔所在位置;(3)加入样品稀释液(空白对照,试剂盒提供)、标准品(试剂盒提供)、种子提取液(试剂盒提供)、叶子提取液(试剂盒提供)、样品等均50 μL至对应的微孔中,轻轻混匀震荡,37℃避光孵育30 min;(4)小心取出微孔板,将孔内液体甩干,加入300 μL洗涤液洗涤3次,每次间隔10 s,并用吸水纸拍干;(5)加入酶标抗体100 μL/孔,轻轻混匀后,放置于37℃摇床上,150 rpm轻摇,孵育20 min,取出后重复步骤(4);(6)加入显色液50 μL,并置微孔板于37℃摇床上,100 rpm轻摇混匀,孵育15 min;(7)加入终止液100 μL,手动轻轻震荡混匀,利用多功能酶标仪(InfiniteM200, Tecan公司,瑞士)测定每孔的OD值,

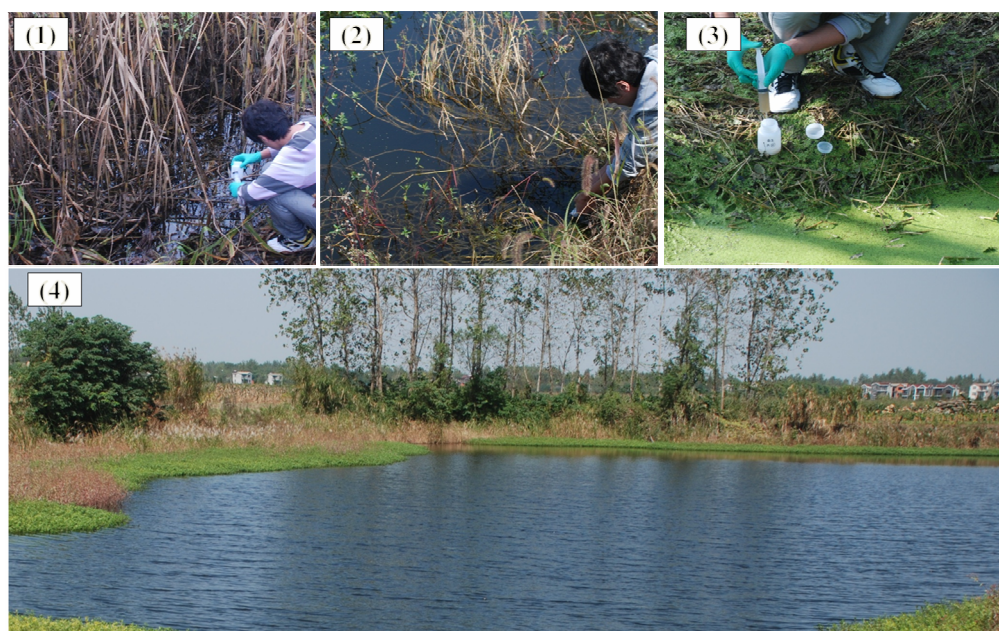


图1 采样点类型。(1)棉田内流动水渠(距离棉田< 50 m);(2)棉田河岸流动河道(距离棉田< 100 m);(3)棉田内封闭水渠;(4)棉田附近流动河道(方圆半径< 1,000 m)。

Fig. 1 Pictures of sampling practical point. (1) The canal flow in cotton fields (distance < 50 m); (2) The river flowing in the river at cotton field edge (distance < 100 m); (3) Closed canal in cotton fields; (4) The river flowing near cotton fields (radius < 1,000 m).

测定波长为450 nm和630 nm。

1.2.3 标准曲线制定

将Cry1Ab/c 蛋白(购自 Envirologix 公司, 货号 ACC-999, 纯度为1.0 ppb)标准品进行梯度稀释后制作标准曲线(图2)。从图中可以看出, 标准曲线线性关系良好, 可用于计算蛋白的浓度, 以判断样品是否含有Cry1Ab/c蛋白。

2 结果

2.1 不同监测距离水体中的Cry1Ab/c蛋白含量

由表2可以看出, 距离棉田越近, 检测出Cry1Ab/c蛋白的几率越大。其中, 棉田内封闭水渠中检测出的阳性率最高, 达到13.3%。棉田附近流动河道未检出阳性结果, 这说明流动河道内水渠聚积物较少, 即便转移到这些水体, 也会降解并被稀释

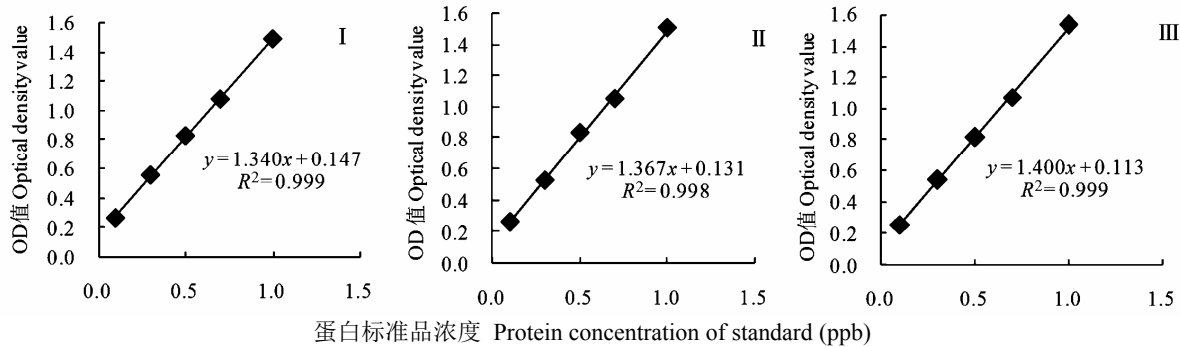


图2 Cry1Ab/c样品标准曲线。(I)山东省; (II)江苏省; (III)安徽省。
Fig. 2 Standard curves of Cry1Ab/c protein sample. (I) Shandong Province; (II) Jiangsu Province; (III) Anhui Province.

表2 不同监测距离的检测样品中Cry1Ab/c蛋白的含量
Table 2 The content of Cry1Ab/c protein was detected in the samples with different distance

	检测结果 Detected results				
	2012.11	2013.7	2013.11	2014.7	2014.11
(1)棉田内流动水渠(距离棉田< 50 m) The canal flow in cotton fields (distance from cotton < 50 m)					
德州陶店村 Taodian Village of Dezhou City	---	---	---	---	---
江苏省农业科学院 Jiangsu Academy of Agricultural Sciences	---	+ - +		---	+++
安庆棉花所 Anqing Cotton Research Institute	---	---	---	---	---
大丰稻麦原种场 Rice and Wheat Seeds stock station of Dafeng City	---	---	---	---	---
(2)棉田河岸流动河道(距离棉田< 100 m) The river flowing in the river of cotton field edge (distance from cotton < 100 m)					
德州宋楼村 Songlou Village of Dezhou City	---	---	---	---	---
宿松复兴村 Fuxing Village of Susong City	---	---	---	---	+++
望江雷池村 Leichi Village of Wangjiang City	---	---	---	---	---
(3)棉田内封闭水渠 Closed canal in the cotton fields					
东营三坝三村 Sanqingsan Village of Dongying City	---	---	---	---	+++
全椒县 Quanjiao County	---	---	- + +	---	---
东至县 Dongzhi County	+++	---	---	---	---
泰州荻垛村 Diduo Village of Taizhou City	---	---	---	---	---
(4)棉田附近流动河道(方圆半径< 1,000 m) The river flowing near cotton fields (radius < 1,000 m)					
滨州西黄村 Xihuang Village of Binzhou City	---	---	---	---	---
启东兴益村 Xingyi Village of Qidong City	---	---	---	---	---
滨城南赵村 Nanzhao Village of Binzhou City	---	---	---	---	---
铜陵市 Tongling City	---	---	---	---	---

“—”表示低于试剂盒最低检测限, “+”表示可以检测到Cry1Ab/c蛋白。
- Below the lowest detection limit of the kit; + Cry1Ab/c protein can be detected.

到检测限下。检出结果中山东省东营市的三顷三村采样点的Cry1Ab/c蛋白含量最高,达到了0.4 ppb,其他地区均在0.04 ppb以下。对于含量高的这些区域应加以防控,持续跟踪监测。

2.2 不同种植年限水体中的Cry1Ab/c蛋白含量

对采样点进行分类,分别为种植年限大于7年和种植年限在3–7年间。由表3可以看出,种植年限大于7年的采样点的Cry1Ab/c蛋白阳性检出率高于种植年限3–7年的地区。其中,全椒、东至和三顷三村3个采样点土壤较为贫瘠,适合种植棉花,其种植年限超过10年,且处于内陆地区,河流较为稀少,检出阳性率较高,达到12.4%。而种植时间在3–7年的取样点,由于种植年限短且管理相对稳定,仅宿松复兴村(也属于内陆地区)有1处检出阳性结果,说明连续种植转基因棉花不会造成边际水体中Cry1Ab/c蛋白含量的不断累积。

2.3 不同采样时间样品Cry1Ab/c蛋白的阳性检出率

在各省份的花铃期前后,即每年7月的Cry1Ab/c蛋白在水体中的残留都在检测限下,蛋白含量的总比率较低(图3)。这说明随着时间的推移,水体中的Cry1Ab/c蛋白并未产生年度富集效应,上一年的残留会在来年全部降解。从收获季节前后的采样结果可以看出,11月的Cry1Ab/c蛋白残留检测比率相对较高,达到了5.3%。就不同省份来说,安徽省近3年的检出率为3.6%,山东省和江苏省的检出率分别为1.35%和2.25%。

3 讨论

通过连续3年在棉花花铃期和收获季节对华东地区三省棉田地块内部及其边际水体随机采样调查发现,棉田地块内部水体中的Cry1Ab/c蛋白含量较高,最高可达0.4 ppb,其余检出点均在0.04 ppb以下。距离棉田越近,检出阳性率越高,其中棉田内水渠阳性率为13.3%。江苏农科院采样点相对较为特殊,因该取样点的河流在科研单位内部,可能会有交叉污染。连续种植时间超过7年的田地周围水体中阳性率为12.4%。在所有随机取样时间点中,

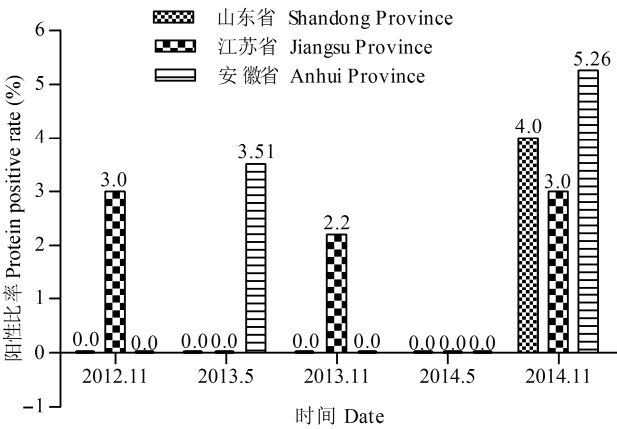


图3 各省份不同采样时间Cry1Ab/c蛋白残留检测的阳性比率
Fig. 3 Cry1Ab/c protein residue detected ratio of samples in different time from three provinces

表3 不同种植年限的检测样品含有Cry1Ab/c蛋白的情况
Table 3 Detected samples Cry1Ab/c protein contents of different cultivated years

种植年限 Cultivated years	检测结果 Detected results				
	2012.11	2013.7	2013.11	2014.7	2014.11
种植年限大于7年 Cultivated more than 7 years					
德州宋楼村 Songlou Village of Dezhou City	---	---	---	---	---
东营三顷三村 Sanqingsan Village of Dongying City	---	---	---	---	+++
全椒县 Quanjiao County	---	---	-++	---	---
东至县 Dongzhi County	+++	---	---	---	---
大丰稻麦原种场 Rice and Wheat Seeds stock station of Dafeng City	---	---	---	---	---
启东兴益村 Xingyi Village of Qidong City	---	---	---	---	---
江苏农科院 Jiangsu Academy of Agricultural Sciences	---	++-	---	---	+++
种植年限3至7年 Cultivated between 3 to 7 years					
滨州南赵村 Nanzhao Village of Binzhou City	---	---	---	---	---
德州陶店村 Taodian Village of Dezhou City	---	---	---	---	---
宿松复兴村 Fuxing Village of Susong City	---	---	---	---	+++
安庆棉花所 Anqing Cotton Research Institute	---	---	---	---	---
泰州荻垛村 Diduo Village of Taizhou City	---	---	---	---	---

收获季有3处共9次检测到Cry1Ab/c蛋白, 而花铃期有2处共4次检测到Cry1Ab/c蛋白。因此, 笔者认为收获季相比花铃期更容易检测到Cry1Ab/c蛋白。这表明转*Bt*基因棉花的种植可能会对边际水体中的Cry1Ab/c蛋白残留造成影响, 特别是在收获季节, 因此应进行适当的指导和监控, 以减少转*Bt*基因棉花对边际水体的影响。

有研究发现, *Bt*蛋白可溶于水中, 在风和强降水引发的地表径流作用下, 可从陆地转移到河流(Tank et al, 2010), 从而使邻近水域中的生物有接触到*Bt*蛋白的可能。本研究在不同时间段对华东三省棉产区附近的边际水体进行分批次随机取水样, 通过ELISA方法对河流及封闭水渠中的Cry1Ab/c蛋白含量进行分析, 进而对*Bt*蛋白的分布状况有了一定了解。大多数农业区域都存在网状的河流通道, 这些河流通道可以迅速地积累并传输水以及相关溶质和碎屑, 本实验取样点均设置在棉田附近水体, 取样点具有代表性, 可以反映整个边际水体的Cry1Ab/c蛋白含量情况。

中国大多数农业区域河流河道复杂交错, 能更迅速地积累并传输*Bt*蛋白。地形区域水文的变化将导致河流水位变动频繁, 从而使包括农副产品在内的陆源碎屑进入河流并向下游移动。我国转*Bt*基因抗虫棉已得到广泛种植, 作物采收后常用的耕作方式是秸秆还田(即保护性耕作), 这种耕作方式可能会促进棉花秸秆碎屑在风和由强降水引发的地表径流作用下, 从陆地转移到河流。降水的随机性使碎屑在一年中的任何时间都可以进入河水中, 棉花采收后, 由于风力或人为堆放的原因, 易导致河道或水渠等出现棉花残枝(采样过程中看到过)。棉花碎屑可能包含*Bt*蛋白, 这些碎屑可随河流扩散到农田以外甚至穿过很大一片区域。我们观察到, 在棉花收获几个月后, 河岸带和河道内积累了大量的棉花碎屑, 这些都可能是Cry1Ab/c蛋白的来源。抗虫棉的广泛种植以及对收获后溪流中积累大量碎屑的观察, 促使我们对棉花碎屑中的*Bt*蛋白以及其在河水中的溶解情况进行调查分析。根据实验结果可以看出, 尽管种植转*Bt*基因抗虫棉的棉产区周围有大量秸秆枯枝碎屑, 但进入水体后, 水中*Bt*蛋白的含量很少, 仅部分棉田内水渠中可以测出。这除了与水体中碎屑量的多少有关外, 还可能与棉花碎屑在水体中的溶解和降解速率有关。

据报道, 转基因抗虫玉米碎屑会进入河流, 并随之漂移(Tank et al, 2010), 可使水生无脊椎动物因食用转基因玉米碎屑而直接受其影响。但玉米碎屑在水环境中发生衰败腐烂后其*Bt*蛋白的去向尚不清楚, 抗虫棉也存在同样的问题。转基因棉花的陆源碎屑一旦进入水渠, 将被微生物分解、物理分解和无脊椎动物食用(Griffiths et al, 2009; Chambers et al, 2010; Swan et al, 2010), 然后迅速降解, 进入河流的食物链。我们在研究中检测到的Cry1Ab/c蛋白都是最近进入边际水体(Zwahlen et al, 2003)。在棉田内的封闭水渠中, 我们检测到Cry1Ab/c蛋白的最高含量可达0.4 ppb, 这可能和封闭河道的输入速率相关。转基因棉花的种植对非靶标生物的影响取决于输入速率、残留速率、分解速率和持久性等因素。本研究表明, 在周围都是网状河流的棉田中, 尽管花铃期中花粉传播占据了优势, 收获季节的检出率仍明显高于花铃期的检出率。如果在更接近收获季节的时间点采样, Cry1Ab/c蛋白残留可能更高。要想更深入了解Cry1Ab/c蛋白残留在时间和空间上的分布情况, 需要了解转基因棉花碎屑和残枝等进入边际水体时其输入速率和输出(分解)速率的相互联系。

从地理位置上来说, 本文主要针对华东地区的山东省、江苏省和安徽省进行了布控点检测, 发现山东和江苏的部分采样点水系分别为靠海靠江区域, 检出率为1.35%和2.25%, 稍低于内陆省份安徽(3.6%)。这可能与不同地区网状河流密集度不同有关。从图3可以看出, 连续3年的采样中, 没有一个采样点连续监测到有Cry1Ab/c蛋白, 即并未表现出富集效应, 这和Stotaky (2004)的研究一致。地下排水渠道的研究表明, 陆源碎屑和土壤中的Cry1Ab/c蛋白会进行垂直移动, 农田中的Cry1Ab/c蛋白可能通过土壤剖面向土壤表面下1 m处的水渠移动, 从而运送到地表水中并进入水渠集中起来(Saxena et al, 2002b)。但我们所检测到的最高浓度对水生生物或微生物有何生态影响, 还需要进一步的研究。

参考文献

- Andrew M (2009) 13.3 million farmers cultivate GM crops. *Nature Biotechnology*, 27, 221–222.
- Carstens K, Anderson J, Bachman P, Schrijver AD, Dively G, Federici B (2012) Genetically modified crops and aquatic ecosystems: considerations for environmental risk assessment and non-target organism testing. *Transgenic Research*,

- 21, 813–842.
- Chambers CP, Whiles MR, Rosi-Marshall EJ, Tank JL, Royer TV, Griffiths NA (2010) Responses of stream macroinvertebrates to Bt maize leaf detritus. *Ecological Applications*, 20, 1949–1960.
- Clive J (2016) The global status of commercialized biotech/GM crops: 2016. *China Biotechnology*, 36(4), 1–11. (in Chinese with English abstract) [Clive J (2016) 2016年全球生物技术/转基因作物商业化发展态势. *中国生物工程杂志*, 36(4), 1–11.]
- Fan LJ, Zhou XP, Hu BM, Shi CH, Wu JG (2001) Gene dispersal risk of transgenic plants. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 12, 630–632. (in Chinese with English abstract) [樊龙江, 周雪平, 胡秉民, 石春海, 吴建国 (2001) 转基因植物的基因漂流风险. *应用生态学报*, 12, 630–632.]
- Griffiths NA, Tank JL, Royer TV, Rosi-Marshall EJ, Whiles MR, Chambers CP, Frauendorf TC, Evans-White MA (2009) Rapid decomposition of maize detritus in agricultural headwater streams. *Ecological Applications Publication of the Ecological Society of America*, 19, 133–142.
- Head G, Surber JB, Watson JA, Martin JW, Duan JJ (2002) No detection of Cry1Ac protein in soil after multiple years of transgenic Bt cotton (bollgard) use. *Environmental Entomology*, 31, 30–36.
- Jiang WL, Ma XY, Peng J, Ma YJ, Ma Y (2014) Seasonal dynamics of diversity of insect communities in transgenic glyphosate-insect-resistant cotton. *Cotton Science*, 26, 105–112. (in Chinese with English abstract) [姜伟丽, 马小艳, 彭军, 马亚杰, 马艳 (2014) 转基因抗草甘膦抗虫棉田害虫群落多样性季节动态研究. *棉花学报*, 26, 105–112.]
- Liu B, Wang L, Zeng Q, Meng J, Hu W, Li X (2009) Assessing effects of transgenic Cry1Ac cotton on the earthworm *Eisenia fetida*. *Soil Biology & Biochemistry*, 41, 1841–1846.
- Lu YH, Wu KM, Jiang YY, Bing X, Ping L, Feng HQ (2010) Mirid bug outbreaks in multiple crops correlated with wide-scale adoption of Bt cotton in China. *Science*, 328, 1151–1154.
- Prihoda KR, Coats JR (2007) Aquatic fate and effects of *Bacillus thuringiensis* Cry3bb1 protein: toward risk assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 27, 793–798.
- Saxena D, Flores S, Stotzky G (2002a) Vertical movement in soil of insecticidal Cry1Ab protein from *Bacillus thuringiensis*. *Soil Biology and Biochemistry*, 34, 111–120.
- Saxena D, Flores S, Stotzky G (2002b) Bt toxin is released in root exudates from 12 transgenic corn hybrids representing three transformation events. *Soil Biology and Biochemistry*, 34, 133–137.
- Stotzky G (2004) Persistence and biological activity in soil of the insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis*, especially from transgenic plants. *Plant & Soil*, 266, 77–89.
- Sun CX, Chen LJ, Wu ZJ, Zhang YL, Zhang LL (2003) Effect of transgenic Bt rice planting on soil enzyme activities. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 14, 2261–2264. (in Chinese with English abstract) [孙彩霞, 陈利军, 武志杰, 张玉兰, 张丽莉 (2003) 种植转Bt基因水稻对土壤酶活性的影响. *应用生态学报*, 14, 2261–2264.]
- Swan CM, Jensen PD, Dively GP, Lamp WO (2010) Processing of transgenic crop residues in stream ecosystems. *Journal of Applied Ecology*, 46, 1304–1313.
- Tank JL, Rosi-Marshall EJ, Royer TV, Whiles MR, Griffiths NA, Frauendorf TC (2010) Occurrence of maize detritus and a transgenic insecticidal protein (Cry1Ab) within the stream network of an agricultural landscape. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 107, 17645–17650.
- Thomas EN (2008) Planning environmental risk assessment for genetically modified crops: problem formulation for stress-tolerant crops. *Plant Physiology*, 6, 494–502.
- Viktorov AG (2011) Transfer of Bt corn byproducts from terrestrial to stream ecosystems. *Russian Journal of Plant Physiology*, 58, 543–548.
- Wang HX, Chen X, Tang JJ, Shimizu K (2002) Influence of released transgenic pest and disease-resistant crops on plant associated microorganisms in soil. *Biodiversity Science*, 10, 232–237. (in Chinese with English abstract) [王洪兴, 陈欣, 唐建军, 志水胜好 (2002) 释放后的转抗病虫基因作物对土壤生物群落的影响. *生物多样性*, 10, 232–237.]
- Wang LG, Li F, Liu QH, Liu ZJ, Liu RZ (2014) Research progress on biosafety of transgenic Bt cotton. *Shandong Agricultural Sciences*, 7, 150–156. (in Chinese with English abstract) [王立国, 李菲, 刘勤红, 柳展基, 刘任重 (2014) 转Bt基因抗虫棉的生物安全性研究进展. *山东农业科学*, 7, 150–156.]
- Xing ZJ, Wang ZY, He KL, Bai SX (2010) Degradation dynamics of crylab insecticidal protein within transgenic *Bacillus thuringiensis* corn root debris and rhizosphere soil in field. *Scientia Agricultura Sinica*, 43, 4970–4976. (in Chinese with English abstract) [邢珍娟, 王振营, 何康来, 白树雄 (2010) 转Bt基因抗虫玉米根茬和根际土壤中Cry1Ab杀虫蛋白的田间降解动态. *中国农业科学*, 43, 4970–4976.]
- Zhang L, Hu WJ, Shen WJ, Fang ZX, Liu B (2015) Residue of Cry1Ab/c protein in soil and water of paddy field cultivated with Bt-SY63 rice for years in a row. *Journal of Ecology and Rural Environment*, 31, 534–539. (in Chinese with English abstract) [张莉, 胡文军, 沈文静, 方志翔, 刘标 (2015) 多年连续种植转基因Bt汕优63稻田水体和土壤中Cry1ab/c蛋白残留调查. *生态与农村环境学报*, 31, 534–539.]
- Zwahlen C, Hilbeck A, Gugerli P, Nentwig W (2003) Degradation of the Cry1Ab protein within transgenic *Bacillus thuringiensis* corn tissue in the field. *Molecular Ecology*, 12, 765–775.

(责任编辑: 卢宝荣 责任编辑: 黄祥忠)