

转基因棉花对土壤生态环境的影响

蔡 红^{1,2} 沈仁芳^{1*}

(1 土壤与农业可持续发展国家重点实验室(中国科学院南京土壤研究所) 南京 210008;

2 中国科学院研究生院 北京 100049)

摘 要 总结了转基因棉花在生态安全性方面的研究进展,重点介绍了转基因棉花对土壤生态环境的影响,包括:外源基因表达产物在土壤中的富集;外源基因表达产物对土壤生物的影响;外源基因在土壤生态系统中的水平转移。认为目前对转基因棉花的土壤生态学过程的研究较少,尚难以确定转基因棉花对土壤生态环境的影响程度。并由此介绍了 Biolog 系统和 DNA 指纹技术在土壤生态安全性研究中的应用。

关键词 转基因棉花;生态安全;土壤

中图分类号 S154.1; Q788

转基因棉花的研究始于上世纪 80 年代。1985 年 Horsch^[1]首次报道了农杆菌介导法将外源基因导入烟草和矮牵牛的研究,自此转基因植物大量涌现,仅最近 15 年里就已经转化了 100 多种植物,比较成功的有玉米、小麦、大豆、西红柿、马铃薯、棉花、水稻等^[2]。至 2002 年,全球转基因作物种植面积超过 5870 万 hm²^[3]。

随着转基因植物的不断增加和应用,其安全性问题逐渐引起了人们的重视。转基因植物的田间释放是否会引起外源基因向其他物种渗透,是否会对生态环境造成危害,这是转基因植物商业化生产前必须明确的问题。因此,本文在综述转基因棉花安全性研究进展的基础上,重点阐述了转基因棉花对土壤生态环境的影响。

1 转基因棉花的生态风险

转基因棉花生态风险方面关注最多的是转 Bt 基因棉花。Bt 是对苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*)的简称,这是一种广泛存在于土壤中的微生物,曾被作为生物杀虫剂使用了 50 多年。转 Bt 基因棉花的安全性研究主要有如下几个方面的内容。

1.1 Bt 蛋白时空表达的不稳定性

外源基因在不同棉花品种和不同组织及部位有不同的表达量^[4],并且在整个生长季节中,Bt 棉花

的杀虫功效是不断变化的^[5]。Bt 蛋白的表达水平在整个生长季节中呈下降的趋势^[6]。在室内进行的生物测定实验发现棉铃虫(*Helicoverpa armigera*)幼虫校正死亡率与其杀虫蛋白表达量高度一致。但是,在田间,由于受多种因素的影响,田间表现与 Bt 杀虫蛋白含量有一定的差异^[7]。Bt 蛋白时空表达的不稳定性提高了害虫生存几率,因此提高了害虫的抗性进化风险。

1.2 外源基因逃逸的风险

外源基因逃逸途径方面,对花粉扩散的研究进行较多。花粉的扩散主要影响近缘物种的遗传纯度,还可能向其他物种渗透。张宝红和郭腾龙^[8]用抗虫性为指标,发现 50 m 的隔离距离可以使花粉的传播距离降到 0,同时他们以是否具备除草剂抗性的表型指标研究了一种抗除草剂转基因棉花的转基因花粉散布距离,认为 50 m 的隔离距离已经足够使转基因逃逸的概率降为 0,并认为建立 50 ~ 100 m 的隔离带能有效地防止外源基因向周围环境扩散。沈法富等^[9]研究了转基因陆地棉品种间和海岛棉与陆地棉种间的 Bt 基因流,结果表明,在 0 ~ 6 m 内陆地棉品种间显示较高频率的基因流,随距离增加 Bt 基因流降低,最大可达 36 m;海岛棉与陆地棉种间 Bt 基因流在 0 ~ 6 m 内比陆地棉品种间低,但 Bt 基因流随距离增加下降幅度小,最远达 72 m。他们的研究还表明,Bt 基因流受到传粉昆虫的类型、种群

①国家重大基础研究规划(973)项目(2002CB410811)、中国科学院“引进国外杰出人才”资助项目、中国科学院知识创新工程项目(ISSASIP0203)资助。

* 通讯作者(rfshen@issas.ac.cn)

等环境因素的影响^[9]。此外,魏伟等^[10]认为转基因作物释放的面积也可能会影响到转基因花粉的传播距离,因此,仅仅建立隔离带并不能完全阻止外源基因的扩散。携带 Bt 基因的花粉会污染其他棉花,也可能转化野生亲缘种,使之变为杂草。

为防止外源基因通过花粉转化其他生物, Daniell 等^[11]提出了外源基因转化叶绿体基因组的解决途径,即利用叶绿体质体无性遗传的特点避免花粉携带外源基因,可以从根本上解决转基因花粉扩散后转化亲缘物种形成杂草的危险。

1.3 害虫的抗性进化风险

目前转基因棉花所使用的 Bt 基因都是经过人工改造过的,能够持续高效地表达单一的杀虫晶体蛋白,并且所表达的 Bt 蛋白是已经具有活性的毒蛋白,与 Bt 杀虫剂相似。由于单一的杀虫毒素的持续表达,转 Bt 植物对害虫的选择压力甚至比 Bt 杀虫剂还要高,因而害虫很有可能以更快的速度进化出对 Bt 的抗性。害虫对 Bt 作物的抗性一旦产生,不但 Bt 作物对害虫失去控制,而且 Bt 杀虫剂也将变得毫无价值。迄今为止,在田间和实验室研究中已经发现有十多种昆虫对 Bt 杀虫毒蛋白产生了抗性^[10]。

针对害虫抗性进化的治理措施主要有转双价基因抗虫棉、避难所、提高杀虫蛋白表达水平等。其中避难所措施就是在田间为非抗性害虫提供生存环境,利用非抗性害虫来稀释抗性害虫的抗性基因^[12]。

1.4 对非目标生物的影响

转基因棉花除了对目标生物发生作用外,还可能直接或间接地对非目标生物发生作用。杨益众等^[13]比较了常规棉田和转基因棉田棉铃虫寄生性天敌的寄生率,发现无论在棉铃虫卵期还是幼虫期,转基因棉花品种(系)的棉铃虫卵、幼虫寄生率均显著低于常规棉花品种上的寄生率,认为转基因棉花对棉铃虫寄生性天敌存在非亲和性。

2 转基因棉花对土壤生态环境的影响

转基因棉花与其他转基因植物一样会对土壤生态环境施加影响,主要表现为:

2.1 外源基因表达产物在土壤环境中富集

研究表明,由 Btk (66 kDa, 抗鳞翅目昆虫) 和 *B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis* (Btt; 68 kDa, 抗鞘翅目昆虫) 产生的毒素可以很快 (<30 min) 吸附在土壤矿质黏粒(蒙脱石和高岭石)、土壤黏粒级颗

粒、腐殖酸以及羧基腐殖酸铝复合体上,且用双倍蒸馏水和 1 mol NaCl 也难以洗脱。吸附态的杀虫毒素能够抵抗微生物的分解,而自由态的毒素则显著降低^[14]。这表明,根系分泌物和转基因植物根系细胞脱落物中的毒素只有很少的自由态被微生物快速降解^[15]。转基因植物的杀虫毒素主要通过根系分泌物^[16]和作物收割后的残体^[17]进入土壤,还可能通过花粉进入。把提纯的 *B. thuringiensis* subsp. *Kurstaki* (Btk) 毒素加入未灭菌的土壤中,杀虫毒素对烟草天蛾幼虫 (*Manduca Sexta*) 的抑制活性 234 天后仍能够检测到^[18],毒素与土壤活性颗粒的结合减少了微生物的降解,可能是其在土壤中存在时间较长的原因^[18]。

2.2 外源基因表达产物对土壤生物的影响

由于转基因毒素与土壤活性颗粒结合在一起,因此会在环境中富集,在加强对目标害虫杀伤的同时,也会对非目标生物产生影响。Tesfaye 等^[19]研究了转基因紫花苜蓿对土壤微生物和土壤元素的影响,发现转基因紫花苜蓿过量表达一种苹果酸脱氢酶 cDNA,与普通紫花苜蓿相比其根际微生物群落功能多样性和硝酸可提取态 P、K、Mn、Zn、Cu 的含量显著提高。Glandorf 等^[20]研究了抗真菌和细菌转基因烟草对腐生型土壤细菌(如菌根和根瘤菌等)的影响,发现抗真菌和细菌蛋白会残留在根际土壤中,从而影响腐生型土壤细菌的数量。但不同外源基因对土壤生态系统的影响可能存在很大差异,例如 Bt 杀虫毒素对土壤中小型生物的影响并不显著,Saxena 和 Stotzky^[21]用转 Bt 基因玉米与土壤微生物和土壤动物共培养和直接用转 Bt 基因玉米秸秆处理土壤,发现 Bt 毒素存在于蚯蚓肠道和排泄物中,但在新鲜土壤中培养 2~3 天,蚯蚓肠道内的毒素即可排出体外。实验还证明,Bt 毒素 Cry1Ab 杀虫蛋白对蚯蚓、线虫、原生动物、细菌、真菌和放线菌没有毒性,与对照相比,Bt 玉米根际土壤及 Bt 玉米秸秆直接处理的土壤,上述土壤生物没有显著变化。吴伟祥等^[22]用转 Bt 基因水稻与亲本水稻的秸秆处理土壤,结果表明,转 Bt 基因克螟稻秸秆中的 Cry1Ab 蛋白对土壤可培养的微生物没有明显的毒害作用。Donegan 等^[23]用 3 种转 *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (B.T.K.) 基因的棉花叶片和提纯的 B.T.K 处理土壤并监测了土著细菌和真菌种群和数量的变化,发现其中两种转基因棉花的处理促进了细菌和真菌种群的增长,另外一种棉花和提

纯的 B.T.K 处理对细菌和真菌数量没有显著的影响,因此认为基因转化操作和组织培养过程可能导致植物性状的改变而影响土壤微生物的增长和种群组成。

2.3 外源基因在土壤生态系统中发生水平转移

土壤中细菌吸收自由 DNA 片段而引发的自然转化是土壤介导的基因转移机制^[24, 25]。Smalla 等^[26]利用 PCR 技术分析了转基因甜菜和马铃薯外源基因在土壤中的残留情况,发现此种 DNA 可在土壤中持续存在。Hoffmann 等^[27]证实转基因植物中的外源基因水平转移到了其他微生物中。他们发现,转基因油菜、黑芥菜、蒺藜和甜豌豆中的抗生素基因可通过转基因植株的根系分泌物转移到一种能与植物共生的黑曲霉微生物中。

3 运用 Biolog 系统和 DNA 指纹技术研究转基因棉花对土壤生态系统的影响

在土壤生态系统中,微生物是维持土壤生物活性的重要组分,它们不仅调节着土壤动植物残体、有机物质和其他有害化合物的分解、调节着生物化学循环和土壤结构的形成,且对外界干扰比较敏感,微生物活性和群落结构的变化能灵敏地反映出土壤质量和健康状况,是土壤环境质量评价不可缺少的重要生物学指标^[28]。植物根系是影响微生物活性的极为重要的组分,由植物根系向土壤中释放的 C 源占根系总 C 源的 40%~90%^[29]。因此,评价转基因棉花对土壤生态系统的影响不能不考虑根系释放对土壤微生物的影响。传统的微生物学研究方法主要基于土壤微生物的分离鉴定,但由于微生物个体微小,形态相近,因此只能给出极为有限的微生物群落组成信息,远远不能够满足土壤环境质量评价的需要。近年来,各种基于生物标志物(biomarker)的测定方法(微生物醒法,脂肪酸法等)和分子生物学方法(FISH, TGGE, DGGE 等)相继得到了广泛应用。这些方法无须分离培养就可反映微生物的群落结构信息,其中 Biolog 方法在反映微生物群落总体活性与代谢功能信息方面具有独到之处^[30],其原理是利用 Biolog 微平板上的单一 C 源底物培养微生物,利用微生物对不同 C 源的代谢差异研究其群落功能多样性^[31]。由于该方法具有简易、快捷、高效、准确、测试范围广等优点,因而已被广泛应用于土壤环境质量评价的研究。

但是 Biolog 方法也有一定的缺陷,如该方法对

底物的浓度较为敏感、C 源选择偏向于简单的碳水化合物、难以检测真菌活性等。另外,该方法不能具体指出微生物群落结构组成,有些稀有种群(如低密度或空间分布不均匀的微生物种群)可能对功能多样性的贡献较大^[32, 33],因此有必要把 DNA 多态性的研究技术引入 Biolog 系统。

DNA 多态性的研究被广泛用于生物的分类鉴定和基因的分析比较,在系统学研究方面是形态学分类和鉴定的重要辅助措施。其中 DNA 指纹技术是研究微生物基因多样性的最为有效的工具之一,已被广泛应用于物种鉴定^[34]。

将 Biolog 系统与 DNA 指纹技术结合起来能够比较全面地考察土壤微生物群落的组成信息从而更有效地监测土壤微生物群落的时空变化^[35, 36],因而可以为转基因棉花的土壤生态学效应研究提供强有力的支持。

4 转基因棉花对土壤生态环境的影响研究展望

目前尚不能肯定转基因棉花是否会对人类生存环境产生危害,但由于转基因棉花的应用范围广,释放面积大,因此还必须继续加强其安全性评价的研究工作。由于转基因棉花应用于物质与能量交流极其频繁的开放环境体系,因而对其安全性的评价只有建立在生态学和环境科学的基础上才具有更大的意义。但是,在转基因棉花的生态安全性评价中对土壤生态环境的研究较少,尚未发现转基因棉花根系活动与土壤酶、土壤微生物、土壤圈物质循环相互关系研究的报道,然而土壤既是转基因植物外源基因及其表达产物储存的重要场所又是生物圈的中心环节,是微生物的最后栖息地^[37],土壤环境质量状况还与农产品质量安全问题息息相关^[38],因此,开展外源基因的土壤生态学过程的研究将是转基因棉花生态风险评价工作的必由之路。

参考文献

- 1 Horsch RB, Fry JE, Hoffman NL, Wallroth M, Eichholtz D, Rogers SG, Frailey RT. A simple and general method for transferring genes into plants. *Science*, 1985, 227: 1229 ~ 1231
- 2 Babu RM, Sajeena A, Seetharaman K, Reddy MS. Advances in genetically engineered (transgenic) plants in pest management—An overview. *Crop Protection*, 2003,

- 22: 1071 ~ 1086
- 3 金银根, 魏传芬, 吴进才. 转基因抗除草剂作物的基因流与杂草化机理探讨. 杂草科学, 2003, (2): 6 ~ 10
 - 4 张俊, 郭香墨, 马丽华. 不同转基因棉的抗虫性与 Bt 毒蛋白含量关系研究. 棉花学报, 2002, 14 (3): 158 ~ 161
 - 5 耿军义, 张香云, 王兆晓, 崔瑞敏, 闫芳教, 孟春风, 贾记豪. Bt 基因在不同陆地棉基因型的表达研究. 棉花学报, 2003, 15 (1): 8 ~ 12
 - 6 Holt HE. Season-long quantification of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal protein in field grown transgenic cotton. In: Zalucki, M, Drew R. eds. Pest Management-Future Challenge. Proceeding of the 6th Australian Applied Entomology Conference, Brisbane, 1998, 1: 215 ~ 222
 - 7 魏伟, 裴克全, 桑卫国, 钱迎倩, 马克平. 转 Bt 基因棉花生态风险评价的研究进展. 植物生态学报, 2002, 26 (增刊): 127 ~ 132
 - 8 张宝红, 郭腾龙. 转基因棉花基因花粉散布频率及距离的研究. 应用与环境生物学报, 2000, 6 (1): 39 ~ 42
 - 9 沈法富, 于元杰, 张学坤, 毕建杰, 尹承岱. 转基因棉花的 Bt 基因流. 遗传学报, 2001, 28 (6): 562 ~ 567
 - 10 魏伟, 钱迎倩, 马克平. 害虫对转基因 Bt 作物的抗性及其管理对策. 应用与环境生物学报, 1999, 5 (2): 215 ~ 228.
 - 11 Daniell H, Datta R, Varma S, Gray S, Lee SB. A green solution to gene escape: Containment of herbicide resistance through genetic engineering of the chloroplast genome. Nat. Biotechnol., 1998, 16: 345 ~ 348
 - 12 张少燕, 谢宝瑜. 转基因棉花 Bt 毒蛋白的表达及其生态学效应. 昆虫知识, 2002, 39 (5): 328 ~ 335
 - 13 杨益众, 余月书, 任璐, 邵益栋, 钱坤, 王建军, 戴志一. 转基因棉花对棉铃虫天敌寄生率的影响. 昆虫知识, 2001, 38 (6): 435 ~ 437
 - 14 Crecchio C, Stotzky G. Biodegradation and insecticidal activity of the toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* bound on complexes of montmorillonite-humic acids-Al hydroxypolymers. Soil Biology and Biochemistry, 2001, 33: 573 ~ 581
 - 15 Stotzky G. Persistence and biological activity in soil of insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis* and of bacterial DNA bound on clays and humic acids. Journal of Environmental Quality, 2000, 29: 691 ~ 705
 - 16 Saxena D, Stotzky G. Insecticidal toxin from *Bacillus thuringiensis* is released from roots of transgenic Bt corn in vitro and in situ. FEMS Microbial Ecology, 2000, 33: 35 ~ 39
 - 17 Tapp H, Stotzky G. Persistence of the insecticidal toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* in soil. Soil Biology and Biochemistry, 1998, 30: 471 ~ 476
 - 18 Crecchio C, Stotzky G. Insecticidal activity and biodegradation of the toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* bound to humic acids from soil. Soil Biology and Biochemistry, 1998, 30: 463 ~ 470
 - 19 Tesfaye M, Dufault NS, Dornbusch MR, Allan DL, Vance CP, Samac DA. Influence of enhanced malate dehydrogenase expression by alfalfa on diversity of rhizobacteria and soil nutrient availability. Soil Biology and Biochemistry, 2003, 35: 1103 ~ 1113
 - 20 Glandorf DCM, Bakker PAHM, Van Loon LC. Influence of the production of antibacterial and antifungal proteins by transgenic plants on the saprophytic soil microflora. Acta Bot Neerlandica, 1997, 46 (1): 85 ~ 104
 - 21 Saxena D, Stotzky G. *Bacillus thuringiensis*(Bt) toxin released from root exudates and biomass of Bt corn has no apparent effect on earthworms, nematodes, protozoa, bacteria and fungi in soil. Soil Biology and Biochemistry, 2001, 33: 1225 ~ 1230
 - 22 吴伟祥, 叶庆富, 闵航, 陈华儿. 克螟稻秸秆 cry1Ab 基因表达产物对土壤生物学活性的影响. 土壤学报, 2003, 40 (4): 606 ~ 612
 - 23 Donegan KK, Palm CJ, Fieland VJ, Porteous LA, Ganio LM, Schaller DL, Bucaro LQ, Seidler RJ. Changes in levels, species and DNA fingerprints of soil microorganisms associated with cotton expressing the *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* endotoxin. Applied Soil Ecology, 1995, 2: 111 ~ 124
 - 24 Yin X, Stotzky G. Gene transfer among bacteria in natural environments. Advances in Applied Microbiology, 1997, 45: 153 ~ 212
 - 25 Davidson J. Genetic exchange between bacteria in the environment. Plasmid, 1999, 42: 73 ~ 91
 - 26 Smalla K, Gebhard F, Elsas JD. Bacterial communities influenced by transgenic plants, The biosafety results of field tests of genetically modified plants and microorganisms. Proceedings of the 3rd International Symposium, Monterey, California, USA, 1994, 157 ~ 167

- 27 Hoffmann T, Golz C, Schieder O. Foreign DNA sequences are received by a wild-type strain of *A.niger* after co-culture with transgenic higher plants. *Current Genetics*, 1994, 27: 70 ~ 76
- 28 滕应, 黄昌勇, 骆永明, 龙健, 姚槐应. 铅锌银尾矿区土壤微生物活性及其群落功能多样性研究. *土壤学报*, 2004, 41 (1): 113 ~ 119
- 29 Lynch JM, Whipps JM. Substrate flow in the rhizosphere. *Plant Soil*, 1990, 129: 1 ~ 10
- 30 席劲瑛, 胡洪营, 钱易. Biolog 方法在环境微生物群落研究中的应用. *微生物学报*, 2003, 43 (1): 139 ~ 141
- 31 Garland JL, Mills AL. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level sole-carbon-source utilization. *Applied and environmental Microbiology*, 1991, 57: 2351 ~ 2359
- 32 Zak JC, Willig MR, Moorhead DL, Wildman HG. Functional diversity of microbial communities: A quantitative approach. *Soil Biology and Biochemistry*, 1994, 26: 1101 ~ 1108
- 33 Preston-Mafham J, Boddy L, Randerson PF. Analysis of microbial community functional diversity using sole-carbon-source utilisation profiles—A critique. *FEMS Microbiology Ecology*, 2002, 42: 1 ~ 14
- 34 刘作易. DNA 指纹技术的发展及其在真菌分类上的应用. *山地农业生物学报*, 2000, 19 (5): 460 ~ 469
- 35 Widmer F, Fließbach A, Laczkó E, Schulze-Aurich J, Zeyer J. Assessing soil biological characteristics: A comparison of bulk soil community DNA-, PLFA-, and Biolog™-analyses. *Soil Biology and Biochemistry*, 2001, 33: 1029 ~ 1036
- 36 Lukow T, Dunfield PF, Liesack W. Use of the T-RFLP technique to assess spatial and temporal changes in the bacterial community structure within an agricultural soil planted with transgenic and non-transgenic potato plants. *FEMS Microbiology Ecology*, 2000, 32: 241 ~ 247
- 37 Bolter M. Soil: An extreme habitat for microorganisms. *Pedosphere*, 2004, 14 (2): 137 ~ 144
- 38 董元华, 张桃林. 基于农产品质量安全的土壤资源管理与可持续利用. *土壤*, 2003, 35 (3): 182 ~ 186

EFFECTS OF TRANSGENIC COTTONS ON SOIL ECOSYSTEM

CAI Hong^{1,2} SHEN Ren-fang¹

(¹ State Key Laboratory of Soil and Sustainable Agriculture (Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences), Nanjing 210008;

² Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049)

Abstract Ecosafety of transgenic cotton is reviewed in the paper with emphasis on its influence on soil ecosystem, including enrichment of transgenes in soil, effects of transgenes on soil biology, and horizontal transfer of transgenes in soil ecosystem. It is held that since so far not much research has been done on soil ecology of transgenic cotton, it is now hard to determine how much transgenic cottons would affect soil eco-environment. In addition, a brief introduction is given to the application of the Biolog-system and DNA-fingerprints technology to the research on soil ecological safety and safety evaluation of transgenic cotton.

Key words Transgenic cotton, Ecosafety, Soil