

转基因玉米表达的Cry1Ab、PAT和EPSPS蛋白对日本通草蛉幼虫的安全风险评估

高欣欣 全玉东 王振营 白树雄 张天涛 何康来*

(中国农业科学院植物保护研究所, 植物病虫害国家重点实验室, 北京 100193)

摘要: 为评价我国自主研发的转基因玉米表达的Cry1Ab、PAT和EPSPS蛋白对日本通草蛉 *Chrysoperla nipponensis* 幼虫生长发育的安全风险, 通过将外源蛋白混入日本通草蛉人工饲料中的方法, 以加入砷酸二氢钾(KH_2AsO_4)的饲料为阳性对照, 研究了日本通草蛉幼虫取食后的生长发育状况。结果表明: 日本通草蛉取食含Cry1Ab和EPSPS蛋白饲料的幼虫发育历期、茧期、结茧率、羽化率及成虫体重等生物学参数与取食正常饲料处理相比均没有显著差异; 而取食含PAT蛋白饲料的幼虫发育历期和结茧率分别为10.7 d和96.6%, 与取食正常饲料的对照11.1 d和89.9%差异显著, 即饲料中添加PAT蛋白显著提高了幼虫的存活率和发育速率; 取食含 KH_2AsO_4 饲料的日本通草蛉幼虫不能存活到茧期, 说明 KH_2AsO_4 具有显著的杀虫活性。ELISA检测结果表明, 取食了分别添加有3种外源蛋白饲料的日本通草蛉幼虫体内可以检测到相应的Cry1Ab、EPSPS和PAT蛋白, 含量分别为2 758.8~5 210.7、35 018.0~54 426.6、16.8~149.8 ng/g。表明转基因玉米所表达的Cry1Ab、EPSPS和PAT蛋白对日本通草蛉幼虫没有显著的不利影响。

关键词: 日本通草蛉; Cry1Ab/PAT/EPSPS蛋白; 安全性评价; 转基因玉米

The risk assessment of Cry1Ab, EPSPS, and PAT proteins expressed by transgenic corn for Chinese green lacewing *Chrysoperla nipponensis* larvae

Gao Xinxin Quan Yudong Wang Zhenying Bai Shuxiong Zhang Tiantao He Kanglai*

(1. State Key Laboratory of Plant Disease and Insect Pest, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 10093, China)

Abstract: To understand the environmental safety of domestic biotech maize on natural enemies, the impact of Chinese biotech maize events C0030.3.5 expressing Cry1Ab and EPSPS proteins and C0010.1.1 expressing PAT and EPSPS proteins on the development and survival of *Chrysoperla nipponensis* larvae were assessed through diet incorporation bioassay, i.e. Tier-1 Approach. Diet mixed with potassium arsenate (KH_2AsO_4) was the positive control. The results showed that the biological parameters, including larval duration, pupation rate, pupation stage, eclosion rate, and adult fresh weight of *C. nipponensis*, had no significant difference between the tested *C. nipponensis* and the control when the artificial diet contained purified Cry1Ab, EPSPS. However, the larval duration and pupation rate were 10.7 d and 96.6%, respectively, when larvae were fed on diet containing PAT protein, which were significantly shorter and higher than those (11.1 d and 89.9%) of the control. In contrast, the larvae could not develop normally into pupae when they were fed on diet containing KH_2AsO_4 , indicating that KH_2AsO_4

基金项目: 国家转基因生物新品种培育科技重大专项(2016ZX08011-003)

* 通信作者 (Author for correspondence), E-mail: klhe@ippcaas.cn

收稿日期: 2017-01-09

was toxic to the larvae. The ELISA results showed that the contents of Cry1Ab, EPSPS and PAT proteins were 2 758.8–5 210.7, 35 018.0–54 426.6, and 16.8–149.8 ng/g, respectively. The results indicated that the Cry1Ab, EPSPS and PAT proteins expressed by biotech maize events C0030.3.5 and C0010.1.1 had no adverse effects on the survival and development of *C. nipponensis* larvae.

Key words: *Chrysoperla nipponensis*; Cry1Ab/PAT/EPSPS protein; risk assessment; biotech maize

自从1996年第1种转基因作物被种植以来,转基因作物的种植面积在不断增加,2015年全球转基因作物种植面积已经达到1.797亿hm²(James, 2015)。转基因作物在提高经济效益的同时,也减少了农药使用所带来的环境问题。玉米作为一种谷物,在全球范围内被广泛种植,主要作为饲料以及工业原料,仅有21%用于人类食用(Baktavachalam et al., 2015)。转基因抗虫玉米的抗虫基因主要来自苏云金芽胞杆菌 *Bacillus thuringiensis* (Bt)。Bt是一种革兰氏阳性菌,其产生的蛋白具有杀虫活性,其基因被转入到作物中用于防治鳞翅目和鞘翅目的主要害虫(Naranjo, 2009)。

自从转基因作物商业化以来,其安全性就是人们关注的焦点(Romeis et al., 2008),其中转基因作物对非靶标生物的安全性越来越受到关注,尤其是对那些在生态系统中起着重要功能的生物,如天敌(Sanders et al., 2007; Li & Romeis, 2010; Li et al., 2013)、传粉昆虫(Rose et al., 2007; Felke et al., 2010)和经济昆虫(Yao et al., 2006; Yang et al., 2014)的安全风险。转基因作物在商业化之前,必须要进行系统的安全性风险评估以确保其对生物和环境没有不利影响(Romeis et al., 2008)。Losey et al. (1999)报道了取食叶片上有转基因玉米花粉的马利筋草 *Asclepias syriaca* 对大斑蝶 *Danaus plexippus* 幼虫具有不利影响。这一报道引起了科学界的极大关注。然而,后续大量研究表明,在实验室条件下,取食含有大量转基因玉米花粉的马利筋草叶片的确会使大斑蝶的死亡率显著增加(Hellmich et al., 2001),然而在自然条件下,马利筋草叶片上的花粉浓度远低于致死剂量(Sears et al., 2001; Stanley-Horn et al., 2001; Tschenn et al., 2001)。此外,与转基因玉米相比,玉米田的农事操作如除草、叶面喷施杀虫剂等对大斑蝶的影响更大(Oberhauser et al., 2001)。因此转基因玉米花粉对大斑蝶的生态安全为低风险(Gatehouse et al., 2002)。Schmidt et al. (2009)报道了Cry1Ab和Cry3Bb蛋白对二星瓢虫 *Adalia bipunctata* 具有杀虫活性。随后针对这一问题开展了大量研究,证实Cry1Ab和Cry3Bb蛋白对二星瓢虫没有杀

虫活性(Rauschen 2010; Ricroch et al., 2010; Alvarez-Alfageme et al., 2011),并指出Schmidt et al. (2009)的研究方法存在设计缺陷,如其以地中海粉螟 *Ephestia kuehniella* 卵饲养二星瓢虫1龄幼虫的死亡率(7.5%~20.8%)显著高于其它研究者如Alvarez-Alfageme et al. (2011)的试验结果(3%)。

Hilbeck et al. (1998a, b)发现普通草蛉 *Chrysoperla carnea* 幼虫取食含Cry1Ab蛋白的饲料、棉贪夜蛾 *Spodoptera littoralis* 幼虫、欧洲玉米螟 *Ostrinia nubilalis* 幼虫后的存活率与对照相比显著降低,认为Cry1Ab蛋白对普通草蛉幼虫具有不利影响。此后,针对出现的这种不利影响是由Bt蛋白的直接作用还是间接作用引起的研究渐多,早期的研究多通过三级营养关系来验证,选择的研究对象有棉贪夜蛾、禾谷缢管蚜 *Rhopalosiphum padi* 和二斑叶螨 *Tetranychus urticae* 等,这些研究结果证实了之前报道的不利影响是由于猎物营养质量不良引起的,与Bt蛋白无关(Dutton et al., 2002; 2003)。Romeis et al. (2004)将高浓度的Bt蛋白通过蔗糖水直接饲喂给天敌,也没有发现不利影响。之后有报道以碳水化合物作为食物来源及以人工饲料为基础的草蛉安全评价方法,结果均表明Bt蛋白对草蛉幼虫没有不利影响(Lawo & Romeis, 2008; Li et al., 2014a)。Romeis et al. (2014)分析总结了前人的研究结果,认为Cry1Ab蛋白对普通草蛉没有不利影响,从而结束了这一争议。在人们对转基因安全性不断认识的过程中,发展出了系统的转基因作物安全性评价的理论和方法(Romeis et al., 2008)。

日本通草蛉 *Chrysoperla nipponensis* (Okamoto)又名中华通草蛉、中华草蛉,主要异名有 *C. sinica* (Tjeder),是玉米田主要的捕食性天敌,幼虫食性广泛,取食蚜虫、鳞翅目卵及其幼虫、飞虱、螨类等多种田间害虫,在生态系统的调节中起着非常重要的作用。在转基因植物所表达的蛋白对非靶标昆虫安全风险评估的研究中,主要集中在抗虫蛋白对非靶标昆虫的风险评估方面(Romeis et al., 2008),而有关耐除草剂蛋白对非靶标生物的安全风险评估较少。因此,本试验通过以高于转基因玉米(鲜重)组

织内浓度10倍的蛋白添加量,将转基因玉米表达的3种外源蛋白Cry1Ab(抗虫)、EPSPS(耐除草剂)和PAT(耐除草剂)添加到人工饲料中喂食日本通草蛉幼虫,并观察调查对其生长发育的影响,进而评价转基因抗虫、耐除草剂玉米所表达的外源蛋白对日本通草蛉幼虫的安全风险,以期为推进我国转基因玉米的研发和商业化应用提供科学支撑。

1 材料与方法

1.1 材料

供试虫源:日本通草蛉由中国农业科学院植物保护研究所天敌昆虫研究组提供,幼虫以大豆蚜虫 *Aphis glycines* 饲养在温度20~27℃、相对湿度60%~75%、自然光照的温室内;成虫使用人工饲料饲养在温度26±1℃、相对湿度(75±5)%、光照周期16 L:8 D的人工气候箱内。人工饲料由蔗糖和啤酒酵母粉按照1:1的比例组合而成,由沾水的棉花球提供水源,新孵化的幼虫用于试验。亚洲玉米螟 *Ostrinia furnacalis* 在温度27±1℃、相对湿度(75±5)%、光照周期16 L:8 D的养虫室中用人工饲料连续饲养多代,对Bt杀虫蛋白敏感的亚洲玉米螟初孵幼虫用于测定Cry1Ab蛋白的杀虫活性。

试剂及仪器:Cry1Ab、EPSPS、PAT蛋白溶液由北京大北农生物技术有限公司提供,通过大肠杆菌 *Escherichia coli* 表达,与北京大北农生物技术有限公司转基因玉米C0030.3.5和C0010.1.1表达的Cry1Ab、EPSPS、PAT蛋白具有实质等同性,蛋白验证试验由北京大北农生物技术有限公司完成;99% 磷酸二氢钾(KH_2AsO_4),北京华尔博科技有限公司;Cry1Ab/Cry1Ac、EPSPS、PAT酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)检测试剂盒,美国Envirologix公司。Thermo Labsystems Model No. 354酶标仪,芬兰雷勃Thermo Labsystems公司;48孔培养板,美国Corning Incorporated公司。

1.2 方法

1.2.1 Cry1Ab蛋白杀虫活性的测定

参考He et al.(2005)的方法测定Cry1Ab蛋白的杀虫活性,即用蒸馏水将供试Cry1Ab蛋白稀释成0.05、0.1、0.5、1、5、10 $\mu\text{g/g}$ 共6个浓度梯度,以只含蒸馏水为空白对照,与亚洲玉米螟的人工饲料混合均匀。然后将饲料平均分装于48孔培养板中,亚洲玉米螟初孵幼虫被分别接入其中,每孔1头幼虫,7 d之后统计死亡情况并计算死亡率。试验重复2次以检测供试Cry1Ab蛋白的杀虫活性。试验条件为温

度27±1℃、相对湿度(75±5)%、光照周期16 L:8 D。

1.2.2 供试蛋白对日本通草蛉幼虫的安全风险评估

本研究的生测方法采用饲料添加法(Li et al., 2014a),即在日本通草蛉幼虫的人工饲料中添加供试蛋白Cry1Ab、EPSPS和PAT,添加量为转基因玉米组织(鲜重)中浓度的10倍以上,分别为158.0 $\mu\text{g/g}$ Cry1Ab蛋白、2.47 mg/g EPSPS蛋白、753 $\mu\text{g/g}$ PAT蛋白,分别以添加36 $\mu\text{g/g}$ KH_2AsO_4 和水的人工饲料为阳性对照和阴性对照。新孵化的日本通草蛉幼虫被单独饲喂不同处理的人工饲料,观察取食这些饲料后幼虫的发育历期、结茧、羽化、茧期及成虫鲜重等生长发育的生物学参数。每个试验3次重复,每个重复测试38~40头幼虫,饲料每2 d更换1次,1 d内观察2次,记录幼虫生长发育和死亡参数,羽化后的成虫12 h之内分性别称重。试验条件同1.2.2。此外,另将取食饲料9 d的日本通草蛉幼虫保存在-80℃的冰箱里,用于ELISA测定。

1.2.3 日本通草蛉幼虫体内蛋白含量检测

使用ELISA法测定,用Cry1Ab/Cry1Ac、EPSPS、PAT的检测试剂盒检测1.2.2中保存的日本通草蛉幼虫体内的Cry1Ab、EPSPS、PAT蛋白含量,8~10头幼虫作为1个处理,每个处理3次重复。草蛉幼虫用PBST清洗以清除体表附着的蛋白,然后称重并加入1 mL PBST溶液混合后装入2 mL的离心管中,用玻璃匀浆器把样本捣碎;离心后取上清液并适当稀释后用于ELISA检测。按照ELISA试剂盒的操作说明进行测定。其中Cry1Ab和EPSPS蛋白含量测定:将标准品、待测样品分别加入试剂盒中96孔板;摇床上室温下孵育1 h;PBST冲洗3次;加入100 μL 标记酶,摇床上继续摇0.5 h;PBST冲洗3次;加入底物,室温下放置0.5 h;加入终止液;在酶标仪上测定450 nm处的吸光值,绘制标准曲线并计算样品中Cry1Ab和EPSPS蛋白的浓度。PAT蛋白含量检测:将标记酶加入96孔板;再加入标准品、待测样品,膜封后室温下孵育2 h;PBST冲洗3次;加入底物;膜封后室温下放置0.5 h;加终止液后在酶标仪上测定450 nm处的吸光值,绘制标准曲线,计算样品中PAT蛋白的浓度。

1.3 数据分析

Cry1Ab蛋白的杀虫活性使用PoloPlus软件分析,其余试验数据的统计分析利用SPSS 16.0软件进行。幼虫取食不同饲料后的结茧率和羽化率使用卡方检验;幼虫发育历期和茧期使用Mann-Whitney检验;成虫鲜重使用2个独立样本的*t*测验法检验。

2 结果与分析

2.1 Cry1Ab 蛋白对亚洲玉米螟的活性

Cry1Ab 蛋白对亚洲玉米螟具有良好的活性 ($\chi^2=8.060$; $df=10$), 致死中浓度 LC_{50} 为 $0.095 \mu\text{g/g}$ (95% FL: $0.068\sim0.124 \mu\text{g/g}$)。表明本研究使用的 Cry1Ab 蛋白活性良好, 与转基因玉米表达的 Cry1Ab 蛋白实质等同, 可用于后续试验。

2.2 取食 Cry1Ab 蛋白的日本通草蛉生长发育情况

与取食正常饲料相比, 取食含有 Cry1Ab 蛋白饲料的日本通草蛉幼虫在结茧率 ($df=1, \chi^2<0.001, P=$

0.983)、羽化率 ($df=1, \chi^2=0.307, P=0.579$)、幼虫发育历期 ($n=214, Z=-1.422, P=0.155$)、茧期 ($n=91, Z_5=-1.522, P=0.128; n=95, Z_5=-1.591, P=0.112$)、成虫鲜重 ($t_2=-0.006, df=87, P=0.995; t_5=-0.037, df=93, P=0.971$) 等方面均无显著差异。而取食含有 KH_2AsO_4 饲料的日本通草蛉幼虫只有极少数结茧, 结茧率仅为 3.3%, 显著低于取食正常饲料处理 ($\chi^2=183.4, P<0.001$) 的 90.7% 和含 Cry1Ab 饲料处理 ($\chi^2=182.4, P<0.001$) 的 90.6% (表 1)。说明取食供试 Cry1Ab 蛋白对日本通草蛉幼虫的生长发育没有显著影响。

表 1 取食 Cry1Ab 蛋白的日本通草蛉幼虫生物学参数

Table 1 Biological parameters of *Chrysoperla nipponensis* fed directly with artificial diet containing Cry1Ab protein

处理 Treatment	结茧率 ^a Pupation rate (%)	羽化率 ^a Eclosion rate (%)	幼虫发育历期 ^b Larval duration (d)	茧期 ^b Pupal stage (d)		成虫鲜重 ^c Adult fresh weight (mg)	
				雌 Female	雄 Male	雌 Female	雄 Male
正常饲料 Control	90.7±3.7 a	84.0±7.1 a	12.2±0.1 a	8.7±0.1 a	8.6±0.1 a	5.06±0.10 a	4.14±0.06 a
含 Cry1Ab 饲料 Diet containing Cry1Ab	90.6±3.8 a	86.9±2.4 a	12.7±0.2 a	8.8±0.1 a	8.8±0.1 a	5.06±0.09 a	4.14±0.07 a
含 KH_2AsO_4 饲料 Diet containing KH_2AsO_4	3.3±0.8 b	—	—	—	—	—	—

a: 卡方检验法; b: Mann-Whitney U 检验法; c: t 测验法。表中数据为平均数±标准误。同列数据后不同字母表示在 $P<0.05$ 水平差异显著。— 表示在观察期内没有幼虫存活。a: Chi-square test; b: Mann-Whitney U-test; c: t test. Data are mean±SE. Different letters in the same column indicate significant difference at $P<0.05$ level. — indicates that no larva survived during experimental observation period.

2.3 取食 EPSPS 蛋白的日本通草蛉生长发育情况

与对照相比, 取食含有 EPSPS 蛋白饲料的日本通草蛉幼虫在结茧率 ($df=1, \chi^2=0.22, P=0.639$)、羽化率 ($df=1, \chi^2=0.06, P=0.815$)、幼虫发育历期 ($n=213, Z=-1.874, P=0.061$)、茧期 ($n=108, Z_5=-0.252, P=0.801; n=91, Z_5=-0.107, P=0.915$)、成虫鲜重 ($t_2=1.456, df=106, P=0.148; t_5=0.757, df=90, P=0.451$) 等方面均无显著差异。而取食了含有 KH_2AsO_4 饲料的日本通草蛉幼虫只有极少数能够达到茧期, 与取食正常饲料处理 ($df=1, \chi^2=197.1, P<0.001$) 和含 EPSPS 饲料处理均差异显著 ($\chi^2=189.4, P<0.001$) (表 2)。说明供试 EPSPS 蛋白对日本通草蛉的生长发育没有显著影响。

2.4 取食 PAT 蛋白的日本通草蛉生长发育情况

与取食正常饲料相比, 取食含有 PAT 蛋白饲料的日本通草蛉幼虫在羽化率 ($df=1, \chi^2=0.68, P=0.410$)、雄虫茧期 ($n=109, Z_5=-1.163, P=0.245$)、成虫鲜重 ($t_2=0.186, df=101, P=0.853; t_5=-0.240, df=108, P=0.811$) 等方面均无显著差异。取食含有 PAT 蛋白的

日本通草蛉幼虫结茧率达到 96.6%, 显著高于取食正常饲料处理的 89.9% ($df=1, \chi^2=4.288, P=0.038$); 幼虫发育历期和雌虫茧期分别为 10.7 d 和 8.6 d, 均显著低于取食正常饲料处理的 11.1 d ($n=220, Z=-2.348, P=0.019$) 和 9.4 d ($n=101, Z_5=-3.215, P=0.001$)。取食含有 KH_2AsO_4 饲料的日本通草蛉幼虫均不能存活到茧期 (表 3)。表明饲料中添加 PAT 蛋白对日本通草蛉生长发育无不利影响, 反而是有利于日本通草蛉的存活和发育。

2.5 日本通草蛉幼虫体内各蛋白的含量

ELISA 检测结果表明, 在日本通草蛉幼虫体内均可检测到 Cry1Ab、EPSPS、PAT 蛋白, 浓度分别为 $2\ 758.8\sim5\ 210.7$ 、 $35\ 018.0\sim54\ 426.6$ 、 $16.8\sim149.8 \text{ ng/g}$ 。而在取食正常饲料的日本通草蛉幼虫体内未检测到。表明供试日本通草蛉幼虫能够通过取食饲料而摄食目标蛋白, 即采用饲料添加法能够模拟田间日本通草蛉幼虫通过食物链摄食转基因玉米表达的外源蛋白。

表2 取食EPSPS蛋白的日本通草蛉生物学参数

Table 2 Biological parameters of *Chrysoperla nipponensis* fed directly with artificial diet containing EPSPS protein

处理 Treatment	结茧率 ^a Pupation rate (%)	羽化率 ^a Eclosion rate (%)	幼虫发育历期 ^b Larval duration (d)	茧期 ^b Pupal stage (d)		成虫鲜重 ^c Adult fresh weight (mg)	
				雌 Female	雄 Male	雌 Female	雄 Male
正常饲料 Control	91.5±1.8 a	93.6±2.2 a	11.7±0.4 a	9.0±0.1 a	8.8±0.1 a	5.35±0.12 a	4.46±0.10 a
含 EPSPS 饲料 Diet containing EPSPS	89.7±4.5 a	94.3±1.7 a	11.6±0.1 a	9.0±0.0 a	8.8±0.1 a	5.13±0.11 a	4.35±0.10 a
含 KH ₂ AsO ₄ 饲料 Diet containing KH ₂ AsO ₄	0.8±0.8 b	—	—	—	—	—	—

a: 卡方检验法; b: Mann-Whitney U 检验法; c: *t* 测验法。表中数据为平均数±标准误。同列数据后不同字母表示在 $P<0.05$ 水平差异显著。— 表示在观察期内没有幼虫存活。a: Chi-square test; b: Mann-Whitney U-test; c: *t* test. Data are mean±SE. Different letters in the same column indicate significant difference at $P<0.05$ level. — indicates that no larva survived during experiment observation period.

表3 取食PAT蛋白的日本通草蛉生物学参数

Table 3 Biological parameters of *Chrysoperla nipponensis* fed directly with artificial diet containing PAT protein

处理 Treatment	结茧率 ^a Pupation rate (%)	羽化率 ^a Eclosion rate (%)	幼虫发育历期 ^b Larval duration (d)	茧期 ^b Pupal stage (d)		成虫鲜重 ^c Adult fresh weight (mg)	
				雌 Female	雄 Male	雌 Female	雄 Male
正常饲料 Control	89.9±0.1 a	95.3±1.0 a	11.1±0.1 a	9.4±0.2 a	8.7±0.1 a	5.74±0.15 a	4.67±0.09 a
含 PAT 饲料 Diet containing PAT	96.6±2.3 b	97.3±1.6 a	10.7±0.3 b	8.6±0.1 b	8.6±0.1 a	5.72±0.12 a	4.70±0.11 a
含 KH ₂ AsO ₄ 饲料 Diet containing KH ₂ AsO ₄	—	—	—	—	—	—	—

a: 卡方检验法; b: Mann-Whitney U 检验法; c: *t* 测验法。表中数据为平均数±标准误。同列数据后不同字母表示在 $P<0.05$ 水平差异显著。— 表示在观察期内没有幼虫存活。a: Chi-square test; b: Mann-Whitney U-test; c: *t* test. Data are mean±SE. Different letters in the same column indicate significant difference at $P<0.05$ level. — indicates that no larva survived during experiment observation period.

3 讨论

种植转基因作物面对的一个风险是转基因作物对非靶标生物的潜在不利影响,尤其是对在生态系统中具有重要功能的天敌昆虫。转基因作物表达的蛋白会通过食物链的传递作用从植物传递给天敌,从而使天敌暴露于转基因作物所表达的蛋白中。二斑叶螨可以通过取食转基因玉米叶片将Cry1Ab蛋白传递给普通草蛉(Dutton et al., 2002);棉蚜 *Aphis gossypii* 取食转基因棉花将Bt蛋白通过转基因棉花-棉蚜-龟纹瓢虫 *Propylaea japonica* 的食物链传递给龟纹瓢虫(Zhang et al., 2006);转基因水稻表达的Cry1Ab蛋白可以通过水稻-褐飞虱 *Nilaparvata lugens*-拟水狼蛛 *Pirata subpiraticus* 食物链的转移最终在拟水狼蛛体内富集(陈茂等, 2005)。在转基因作物对非靶标昆虫的研究中,目前主要通过实验室-半田间-田间的序贯评价来完成,在实验室研究过程中,又可以分为Tier-1试验、二级营养试验和三

级营养试验(Romeis et al., 2008)。Tier-1试验通过将蛋白加入受试生物饲料中来完成,这样受试生物可以直接暴露在高剂量、远高于田间环境的蛋白浓度中。本试验即采用Tier-1试验,人工饲料中加入的Cry1Ab、EPSPS、PAT蛋白浓度是田间玉米表达量的10倍以上。与用转基因植物组织直接饲喂的二级营养试验及通过植物组织-猎物-天敌的三级营养关系试验相比,Tier-1试验的结果更加可靠(Li et al., 2014b)。为了保证试验结果的有效性,首先研究了供试转基因玉米所表达的Cry1Ab抗虫蛋白活性,该转基因玉米的主要靶标昆虫为玉米螟,本试验使用对Cry1Ab蛋白敏感的亚洲玉米螟进行测试,结果表明供试Cry1Ab蛋白具有很好的杀虫活性。

日本通草蛉幼虫生测试验结果表明,幼虫的结茧率可以达到90%左右,表明了试验结果的可靠性。Bt蛋白通过绑定到靶标昆虫的中肠上从而对靶标昆虫产生不利影响,生理生化研究结果表明普通

草蛉中肠上没有Bt蛋白受体(Rodrigo-Simón et al., 2006)。二化螟 *Chilo suppressalis* 人工饲料-二化螟-日本通草蛉三级营养关系的研究表明,取食Cry2Aa蛋白的二化螟幼虫对日本通草蛉幼虫的存活率和发育历期没有不利影响,然而对幼虫体重产生了不利影响,在随后的研究中将高浓度的Cry2Aa蛋白加入蔗糖水中直接饲喂日本通草蛉幼虫,发现Cry2Aa蛋白对日本通草蛉幼虫没有不利影响,之前产生的不利影响是由于二化螟营养质量降低所引起(Li et al., 2013)。取食含Cry1Ac蛋白棉花叶片的敏感性棉铃虫会对普通草蛉产生不利影响,而对Cry1Ac蛋白有抗性的棉铃虫不会对普通草蛉产生不利影响(Lawo et al., 2010)。Li et al. (2014a)将杀虫蛋白混入人工饲料以研究Cry1Ab、Cry1Ac、Cry2Aa抗虫蛋白对日本通草蛉幼虫的安全风险评估,发现3种抗虫蛋白对幼虫生长发育无不利影响。本试验结果同样证实了取食含Cry1Ab蛋白饲料的日本通草蛉的幼虫发育历期、茧期、结茧率、羽化率、成虫体重等生物学参数与正常饲料处理相比均无显著差异。

EPSPS蛋白是一种耐草甘膦除草剂蛋白,其添加量达到了2.47 mg/g,目前关于耐除草剂蛋白对捕食性天敌的研究较少。本试验结果显示,取食含EPSPS蛋白饲料的日本通草蛉幼虫发育历期、茧期、结茧率、羽化率、成虫体重等生物学参数与取食正常饲料处理相比均没有显著差异,说明这种蛋白对日本通草蛉幼虫具有很好的安全性。田间试验也表明了转 *cry1Ab/vip3H+epsps* 基因水稻对稻叶蝉 *Nephotettix cincticeps* 种群没有不利影响(卢增斌等, 2013)。PAT蛋白是一种耐草丁膦除草剂蛋白,其添加量为753 µg/g。幼虫期取食含PAT蛋白的日本通草蛉发育历期以及雌虫茧期均显著低于对照,结茧率显著高于对照,从生长发育参数来看,PAT蛋白对日本通草蛉幼虫的生长发育更为有利。日本通草蛉幼虫体内能够检测到少量的PAT蛋白,浓度仅为16.8~149.8 ng/g,说明PAT蛋白很容易降解,表明PAT蛋白对日本通草蛉幼虫是安全的。PAT蛋白在人工胃和肠道消化液中会迅速降解,与任何已知的毒素和过敏原都没有同源性序列,没有N-糖基化位点,对人、动物及环境都具有很好的安全性(Hérouet et al., 2005; Center for Environmental Risk Assessment & ILSI Research Foundation, 2011)。

转基因作物对非靶标昆虫安全风险评估的研究在不断的积累和更加深入,这些研究促进了人们关于转基因作物对非靶标生物安全性的认识。本研究结果说明转基因玉米所表达的Cry1Ab、EPSPS、PAT

蛋白对日本通草蛉幼虫生长发育无显著的不利影响。

参考文献 (References)

- Alvarez-Alfageme F, Bigler F, Romeis J. 2011. Laboratory toxicity studies demonstrate no adverse effects of Cry1Ab and Cry3Bb1 to larvae of *Adalia bipunctata* (Coleoptera: Coccinellidae): the importance of study design. *Transgenic Research*, 20(3): 467-479
- Baktavachalam GB, Delaney B, Fisher TL, Ladics GS, Layton RJ, Locke ME, Schmidt J, Anderson JA, Weber NN, Herman RA, et al. 2015. Transgenic maize event TC1507: global status of food, feed, and environmental safety. *GM Crops & Food*, 6(2): 80-102
- Center for Environmental Risk Assessment, ILSI Research Foundation. 2011. A review of the environmental safety of the PAT protein. *Environmental Biosafety Research*, 10(4): 73-101
- Chen M, Ye GY, Lu XM, Hu C, Peng YF, Shu QY, Altosaar I. 2005. Biotransfer and bioaccumulation of Cry1Ab insecticidal protein in rice plant-brown planthopper-wolf spider food chain. *Acta Entomologica Sinica*, 48(2): 208-213 (in Chinese) [陈茂, 叶恭银, 卢新民, 胡萃, 彭于发, 舒庆尧, Altosaar I. 2005. Cry1Ab 杀虫蛋白在水稻-褐飞虱-拟水狼蛛食物链中转移与富集. *昆虫学报*, 48(2): 208-213]
- Dutton A, Klein H, Romeis J, Bigler F. 2002. Uptake of Bt-toxin by herbivores feeding on transgenic maize and consequences for the predator *Chrysoperla carnea*. *Ecological Entomology*, 27(4): 441-447
- Dutton A, Klein H, Romeis J, Bigler F. 2003. Prey-mediated effects of *Bacillus thuringiensis* spray on the predator *Chrysoperla carnea* in maize. *Biological Control*, 26(2): 209-215
- Felke M, Langenbruch GA, Feiertag S, Kassa A. 2010. Effect of Bt-176 maize pollen on first instar larvae of the peacock butterfly (*Inachis io*) (Lepidoptera; Nymphalidae). *Environmental Biosafety Research*, 9(1): 5-12
- Gatehouse AM, Ferry N, Raemaekers RJ. 2002. The case of the monarch butterfly: a verdict is returned. *Trends in Genetics*, 18(5): 249-251
- He K, Wang Z, Wen L, Bai S, Ma X, Yao Z. 2005. Determination of baseline susceptibility to Cry1Ab protein for Asian corn borer (Lep., Crambidae). *Journal of Applied Entomology*, 129(8): 407-412
- Hellmich RL, Siegfried BD, Sears MK, Stanley-Horn DE, Daniels MJ, Mattila HR, Spencer T, Bidne KG, Lewis LC. 2001. Monarch larvae sensitivity to *Bacillus thuringiensis*-purified proteins and pollen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(21): 11925-11930
- Hérouet C, Esdaile DJ, Mallyon BA, Debruyne E, Schulz A, Currier T, Hendrickx K, van der Klis RJ, Rouan D. 2005. Safety evaluation of the phosphinothricin acetyltransferase proteins encoded by the pat and bar sequences that confer tolerance to glufosinate-ammonium herbicide in transgenic plants. *Regulatory Toxicology & Pharmacology*, 41(2): 134-149
- Hilbeck A, Baumgartner M, Fried PM, Bigler F. 1998a. Effects of transgenic *Bacillus thuringiensis* corn-fed prey on mortality and development time of immature *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: Chrysopidae). *Environmental Entomology*, 27(2): 480-487
- Hilbeck A, Moar WJ, Pusztai-Carey M, Filippini A, Bigler F. 1998b. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin to the predator

- Chrysoperla carnea* (Neuroptera: Chrysopidae). Environmental Entomology, 27(5): 1255–1263
- James C. 2015. Global status of commercialized biotech/GM crops: 2015. ISAAA Brief No. 51. ISAAA: Ithaca, NY
- Lawo NC, Romeis J. 2008. Assessing the utilization of a carbohydrate food source and the impact of insecticidal proteins on larvae of the green lacewing, *Chrysoperla carnea*. Biological Control, 44(3): 389–398
- Lawo NC, Wäckers FL, Romeis J. 2010. Characterizing indirect prey-quality mediated effects of a Bt crop on predatory larvae of the green lacewing, *Chrysoperla carnea*. Journal of Insect Physiology, 56: 1702–1710
- Li YH, Hu L, Romeis J, Wang YN, Han LZ, Chen XP, Peng YF. 2014a. Use of an artificial diet system to study the toxicity of gut-active insecticidal compounds on larvae of the green lacewing *Chrysoperla sinica*. Biological Control, 69: 45–51
- Li YH, Romeis J. 2010. Bt maize expressing Cry3Bb1 does not harm the spider mite, *Tetranychus urticae*, or its ladybird beetle predator, *Stethorus punctillum*. Biological Control, 53(3): 337–344
- Li YH, Romeis J, Wu KM, Peng YF. 2014b. Tier-I assays for assessing the toxicity of insecticidal proteins produced by genetically engineered plants to non-target arthropods. Insect Science, 21(2): 125–134
- Li YH, Wang YY, Romeis J, Liu QS, Lin KJ, Chen XP, Peng YF. 2013. Bt rice expressing Cry2Aa does not cause direct detrimental effects on larvae of *Chrysoperla sinica*. Ecotoxicology, 22(9): 1413–1421
- Losey JE, Rayor LS, Carter ME. 1999. Transgenic pollen harms monarch larvae. Nature, 399(6733): 214
- Lu ZB, Han NS, Xu G, Liu YE, Hu C, Peng YF, Guo YY, Ye GY. 2013. Impacts of transgenic *cry1Ab/vip3H + epsps* japonica rice on the population dynamics of its non-target herbivores, rice leafhoppers, under field conditions. Acta Entomologica Sinica, 56(11): 1275–1285 (in Chinese) [卢增斌, 韩乃顺, 徐刚, 刘玉娥, 胡萃, 彭于发, 郭予元, 叶恭银. 2013. 转 *cry1ab/vip3H+epsps* 基因梗稻对非靶标害虫稻叶蝉田间种群的影响. 昆虫学报, 56(11): 1275–1285]
- Naranjo SE. 2009. Impacts of Bt crops on non-target invertebrates and insecticide use patterns. Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources, 4(11): 1–11
- Oberhauser KS, Prysby MD, Mattila HR, Stanley-Horn DE, Sears MK, Dively G, Olson E, Pleasants JM, Lam WKF, Hellmich RL. 2001. Temporal and spatial overlap between monarch larvae and corn pollen. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 98(21): 11913–11918
- Rauschen S. 2010. A case of “pseudo science”? A study claiming effects of the Cry1Ab protein on larvae of the two-spotted ladybird is reminiscent of the case of the green lacewing. Transgenic Research, 19(1): 13–16
- Ricroch A, Bergé JB, Kuntz M. 2010. Is the German suspension of MON810 maize cultivation scientifically justified? Transgenic Research, 19(1): 1–12
- Rodrigo-Simón A, de Maagd RA, Avilla C, Bakker PL, Molthoff J, González-Zamora JE, Ferré J. 2006. Lack of detrimental effects of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins on the insect predator *Chrysoperla carnea*: a toxicological, histopathological, and biochemical analysis. Applied and Environmental Microbiology, 72(2): 1595–1603
- Romeis J, Bartsch D, Bigler F, Candolfi MP, Gielkens MMC, Hartley SE, Hellmich RL, Huesing JE, Jepson PC, Layton R, et al. 2008. Assessment of risk of insect-resistant transgenic crops to nontarget arthropods. Nature Biotechnology, 26(2): 203–208
- Romeis J, Dutton A, Bigler F. 2004. *Bacillus thuringiensis* toxin (Cry1Ab) has no direct effect on larvae of the green lacewing *Chrysoperla carnea* (Stephens) (Neuroptera: Chrysopidae). Journal of Insect Physiology, 50(2/3): 175–183
- Romeis J, Meissle M, Naranjo SE, Li YH, Bigler F. 2014. The end of a myth-Bt (Cry1Ab) maize does not harm green lacewings. Frontiers in Plant Science, 5: 391
- Rose R, Dively GP, Pettis J. 2007. Effects of Bt corn pollen on honey bees: emphasis on protocol development. Apidologie, 38(4): 368–377
- Sanders CJ, Pell JK, Poppy GM, Raybould A, Garcia-Alonso M, Schuler TH. 2007. Host-plant mediated effects of transgenic maize on the insect parasitoid *Camponotus sonorensis* (Hymenoptera: Ichneumonidae). Biological Control, 40(3): 362–369
- Schmidt JEU, Braun CU, Whitehouse LP, Hilbeck A. 2009. Effects of activated Bt transgene products (Cry1Ab, Cry3Bb) on immature stages of the ladybird *Adalia bipunctata* in laboratory ecotoxicity testing. Archives of Environmental Contamination & Toxicology, 56(2): 221–228
- Sears MK, Hellmich RL, Stanley-Horn DE, Oberhauser KS, Pleasants JM, Mattila HR, Siegfried BD, Dively GP. 2001. Impact of Bt corn pollen on monarch butterfly populations: a risk assessment. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 98(21): 11937–11942
- Stanley-Horn DE, Dively GP, Hellmich RL, Mattila HR, Sears MK, Rose R, Jesse LCH, Losey JE, Obrycki JJ, Lewis L. 2001. Assessing the impact of Cry1Ab-expressing corn pollen on monarch butterfly larvae in field studies. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 98(21): 11931–11936
- Tschenn J, Losey JE, Jesse LH, Obrycki JJ, Hufbauer R. 2001. Effects of corn plants and corn pollen on monarch butterfly (Lepidoptera: Danaidae) oviposition behavior. Environmental Entomology, 30(3): 495–500
- Yang Y, Liu Y, Cao FQ, Chen XP, Cheng LS, Romeis J, Li YH, Peng YF. 2014. Consumption of Bt rice pollen containing Cry1C or Cry2A protein poses a low to negligible risk to the silkworm *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombyxidae). PLoS ONE, 9(7): e102302
- Yao HW, Ye GY, Jiang CY, Fan LJ, Datta K, Hu C, Datta SK. 2006. Effect of the pollen of transgenic rice line, TT9-3 with a fused *cry1Ab/cry1Ac* gene from *Bacillus thuringiensis* Berliner on non-target domestic silkworm, *Bombyx mori* Linnaeus (Lepidoptera: Bombyxidae). Applied Entomology & Zoology, 41(2): 339–348
- Zhang GF, Wan FH, Lövei GL, Liu WX, Guo JY. 2006. Transmission of Bt toxin to the predator *Propylaea japonica* (Coleoptera: Coccinellidae) through its aphid prey feeding on transgenic cotton. Environmental Entomology, 35(1): 143–150

(责任编辑:李美娟)