

方志翔,张 莉,沈文静,等. 抗黄萎病转基因棉花对灰巴蜗牛(*Bradybaena ravida*)的影响[J]. 江苏农业科学,2019,47(24):296-299.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.24.065

抗黄萎病转基因棉花对灰巴蜗牛(*Bradybaena ravida*)的影响

方志翔,张 莉,沈文静,郭汝清,刘 标

(生态环境部南京环境科学研究所/国家环境保护生物安全重点实验室,江苏南京 210042)

摘要:为探讨转基因棉花对田间常见非靶标生物的环境安全性,以新型抗黄萎病转基因棉花 JA1 为研究对象,以棉叶直接喂饲和人工饲料添加棉花茎叶粉末的方法,分别喂养灰巴蜗牛(*Bradybaena ravida*) 72 h 和 70 d,期间监测蜗牛的死亡率、取食率、体质量变化和超氧化物歧化酶(SOD)活性变化情况,在室内评价其对灰巴蜗牛可能带来的影响。结果表明,与喂饲亲本棉叶的蜗牛相比,喂饲转基因棉花的蜗牛在上述各方面均未出现明显差异。

关键词:转基因棉花;灰巴蜗牛;安全评价

中图分类号:Q785 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2019)24-0296-03

软体动物是动物界中种类繁多的一个分支,已知种类有 13 万多种^[1]。由于分布地域广泛并且物种极其丰富,软体动物在全球陆地和水生生态系统中都扮演了重要的角色。在指示生物和生物监测领域,软体动物可以被成功地用来获取陆地、海洋和淡水生态系统的环境质量信息^[2]。就目前研究来看,软体动物中的腹足纲最多地应用于环境监测这一领域。腹足纲代表着唯一一类分布在陆地生态系统的软体动物。大部分陆栖腹足纲属于肺亚螺纲,只有少数种类属于前腮亚纲。蜗牛泛指腹足纲的陆生所有种类,生活于灌木丛、矮草丛、农田及住宅附近阴暗潮湿地区,世界各地均有分布。在过去的 20 年间,人们对利用以蜗牛为代表的腹足纲土壤动物进行生物监测展现出越来越浓厚的兴趣,并且开展了一系列卓有成效的研究^[3-7]。

近年来,转基因植物在全球范围内种植规模不断扩大,但是关于其生态环境安全性的争议一直存在,大量的物种被用来对转基因植物的环境生态安全性进行评价^[8]。蜗牛作为一种食谱广泛的植食性生物,很容易在自然条件下直接或间接食用或接触转基因植物。目前不论野生状态下的蜗牛还是人工饲养条件下的蜗牛,其食物来源大多都是植物。另外,蜗牛一部分生活时间在植物根部土壤中,会接触土壤。而目前有文献报道,转基因作物的外源蛋白会随着根系分泌物或者残体降解而残留于土壤中,并持续较长时间^[9-11]。所以,评价转基因植物对蜗牛的影响,对于研究转基因植物对非靶标生物影响以及对自然生态环境影响是十分必要的。国外有学者研究过转 *Bt* 基因作物对蜗牛的影响,也有使用纯化 *Bt* 蛋

白对蜗牛进行毒理试验,但试验结论也是各执一词褒贬不一^[12-16]。

本研究以在我国农田广泛存在的灰巴蜗牛(*Bradybaena ravida*)为研究对象,分别采取了棉叶直接喂饲法和人工饲料添加棉叶法在室内进行了灰巴蜗牛的饲养,研究了抗黄萎病转基因棉花对其的影响。后一种方法避免了现有普通饲养方法易受季节影响,在秋冬季缺少植物鲜活组织从而影响试验,尤其是长期试验进行的弊端,为室内长期蜗牛饲养试验打下了基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本研究所用蜗牛于 2017 年 6 月采集自南京市六合区菜地中,共 50 只,经鉴定为灰巴蜗牛。

抗黄萎病转基因棉花 JA1 由江苏省农业科学院提供,抗黄萎病基因 *Gbvd2* 来源于海岛棉品种海 7124,亲本棉花(CK)为陆地棉品种泗棉 3 号。

1.2 试验设计

1.2.1 饲养条件 本研究于 2017 年 6—10 月在环境保护生物安全重点实验室内进行。将野外采集的蜗牛置于饲养盒中,底部铺 5~10 cm 的人造土壤,其成分包括 40% 黄沙、20% 泥炭土、40% 高岭土,混合均匀后采取湿热灭菌法灭菌,冷却后调节 pH 值为 5~7,湿度 40% 左右,以纱布罩住盒口,置于人工气候箱中,保持温度在 25~30 ℃,空气相对湿度保持 85% 左右,光/暗周期 12 h/12 h。投放无农残的有机青菜叶、空心菜叶预喂饲蜗牛备用。

1.2.2 饲养饲料 喂饲试验分为棉叶直接喂饲和人工饲料添加棉叶粉末喂饲 2 种。

1.2.2.1 棉叶 采集自抗黄萎病转基因棉花 JA1 及其亲本泗棉 3 号,定期采集鲜嫩足量棉叶喂饲蜗牛。

1.2.2.2 人工饲料 人工饲料配方:每份人工饲料包括玉米粉 100 g、大豆粉 100 g、小麦粉 100 g、酵母粉 50 g、磷酸氢钙 30 g、蔗糖 20 g、复合维生素(烟酰胺 1.0 g、硫胺素 0.25 g、核

收稿日期:2018-05-14

基金项目:转基因生物新品种培育重大专项(编号:2016ZX08011-002);环保公益性行业科研专项(编号:201509044)。

作者简介:方志翔(1982—),男,江苏南京人,硕士,助理研究员,主要从事转基因生物安全评价研究。E-mail:zxfang23@126.com。

通信作者:刘 标,博士,研究员,主要从事转基因生物安全评价研究。E-mail:85287064@163.com。

黄素 0.50 g、吡哆素 0.25 g、钴胺素 0.02 g、叶酸 0.25 g、泛酸钙 1.0 g、生物素 0.02 g), 体积分数 40% 的甲醛 1 mL, 加水 600 mL。搅拌均匀后湿热灭菌, 冷却凝固后切成片状置于小的培养皿中, 将培养皿置入土里, 略微露出边沿。

按照试验需要, 在上述人工饲料中添加不同剂量的经超低温冷冻研磨粉碎后的转基因植物组织粉末, 对照组添加亲本植物组织粉末, 喂饲蜗牛。

1.3 试验方法

1.3.1 蜗牛短期喂饲棉叶死亡率试验 以抗黄萎病转基因棉花 JA1 及其亲本棉花幼嫩茎叶喂饲蜗牛, 阳性对照组喂饲涂抹四聚乙醛的菜叶(1 g/g 菜叶), 每组设 3 只贝壳螺旋数接近、大小质量近似的蜗牛, 持续喂饲 72 h, 分别在 24、48、72 h 监测蜗牛的死亡率。

1.3.2 蜗牛取食率试验 测定蜗牛取食棉叶的效率, 挑选贝壳螺旋数接近、大小质量近似的单只蜗牛放入培养瓶, 将不同的棉花叶片打成直径 3 cm 的圆片, 每个培养瓶中放置 1 种棉花叶片 1 张, 2 组处理各设 3 次重复, 记录 24 h 内的取食率。

1.3.3 蜗牛短期喂饲人工饲料试验 以抗黄萎病转基因棉花 JA1 及其亲本棉花茎叶经超低温冷冻研磨后加入饲料喂饲蜗牛, 1 kg 饲料中混入棉花茎叶组织细粉 100 g 和 200 g, 阳性对照组喂饲加入四聚乙醛的饲料。每组设 3 只螺旋数一致、大小质量接近的蜗牛, 持续喂饲 72 h, 分别在 24、48、72 h 监测蜗牛的死亡率。

1.3.4 蜗牛长期喂饲人工饲料试验 以抗黄萎病转基因棉花 JA1 及其亲本棉花喂饲蜗牛, 1 kg 饲料中混入棉花茎叶组织细粉 200 g, 每组设 3 只质量接近的幼贝(3 螺层), 分别称量其体质量并记录, 持续喂饲 70 d, 期间每 14 d 监测 1 次体质量。

1.3.5 蜗牛人工饲料取食率试验 以抗黄萎病转基因棉花 JA1 及其亲本棉花喂饲蜗牛, 1 kg 饲料中混入棉花茎叶组织细粉 200 g, 每组设 3 只螺层、质量接近的成贝(5 螺层以上) 作为重复, 每次喂饲前后对饲料进行称量, 计算 24 h 内蜗牛的取食量。

1.3.6 蜗牛 SOD 酶活 4 号测定 在棉叶短期喂饲试验结束后, 取蜗牛去壳匀浆, 使用 SOD 酶检测试剂盒(南京建成生物公司) 检测其体内 SOD 酶活性。

1.4 数据处理

使用 MS Excel 2010 软件进行数据的处理和作图, 用 SPSS 13.0 软件进行统计分析, 采用单因素方差分析 One-way ANOVA 和最小显著差异法(LSD, $\alpha = 0.05$) 比较不同处理间差异的显著性。

2 结果与分析

2.1 蜗牛短期喂饲叶片死亡率

喂饲不同棉花叶片后的 72 h 内, 不同处理组的死亡率情况见表 1。从表 1 可以看出, 在试验开始的 24、48、72 h 内, 喂饲棉花转基因棉花和亲本棉花叶片的蜗牛均未出现死亡情况, 而喂饲涂抹四聚乙醛棉叶的蜗牛则全部死亡。

2.2 蜗牛叶片取食率

喂饲不同棉花叶片 24 h 后, 不同处理组的取食率见表 2。从表 2 可以看出, 喂饲亲本棉花叶片的蜗牛取食率达

53.18%, 而喂饲转基因棉花 JA1 叶片的蜗牛取食率为 52.13%, 二者对棉花叶片的取食率没有显著性差异。

表 1 蜗牛喂饲叶片急性死亡率

受试物	棉叶剂量	死亡率(%)		
		24 h	48 h	72 h
CK	过量	0	0	0
JA1	过量	0	0	0
蜗克星	1 g	100	100	100

表 2 蜗牛叶片取食率

处理组	取食面积(mm)	取食率(%)
CK	375.69 ± 54.61a	53.18a
JA1	368.31 ± 48.46a	52.13a

注: 同列数据后不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$), 相同小写字母表示差异不显著($P \geq 0.05$)。

2.3 蜗牛短期喂饲人工饲料死亡率

以人工饲料添加棉花茎叶组织粉末喂饲蜗牛, 不同时段蜗牛死亡率见表 3。添加棉花茎叶组的蜗牛不论转基因组还是亲本组, 高剂量组还是低剂量组, 在 72 h 内均未出现死亡情况, 喂饲添加四聚乙醛人工饲料组的蜗牛则全部死亡。

表 3 蜗牛喂饲人工饲料急性死亡率

受试物	剂量(g/kg)	死亡率(%)		
		24 h	48 h	72 h
CK	200	0	0	0
	100	0	0	0
JA1	200	0	0	0
	100	0	0	0
四聚乙醛	10 g	100	100	100

2.4 蜗牛长期喂饲人工饲料试验

蜗牛长期喂饲人工饲料体质量变化情况见图 1。在喂饲转基因棉花及其亲本棉花叶片饲料的 0、14、28、42、56、70 d 分别测定蜗牛的体质量, 在转基因棉花和亲本棉花处理组之间, 其体质量增长趋势一致, 同一时间内, 不同处理组间差异不显著。

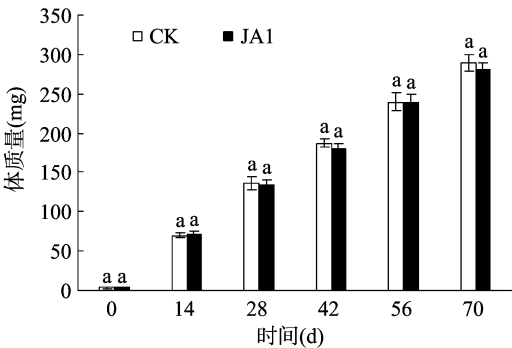


图 1 蜗牛长期喂饲人工饲料体质量变化

2.5 蜗牛喂饲人工饲料取食量测定

使用添加转基因棉花及其亲本棉花粉末的人工饲料喂饲蜗牛, 24 h 内的蜗牛取食量结果见图 2, 在不同处理组之间, 取食量并没有显著性差异。

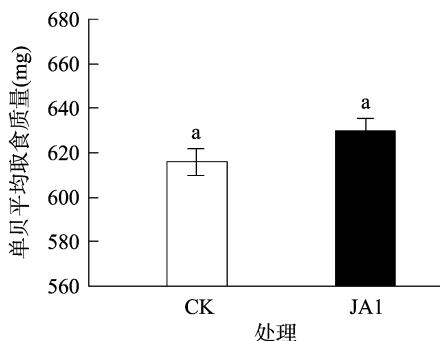


图2 蜗牛喂饲人工饲料取食量

2.6 蜗牛 SOD 酶活测定

在棉叶短期喂饲试验(72 h)结束后,检测了蜗牛 SOD 酶活性,结果见图 3。在喂饲转基因棉花及其亲本棉花叶片的蜗牛之间,其体内 SOD 酶活没有显著性差异。

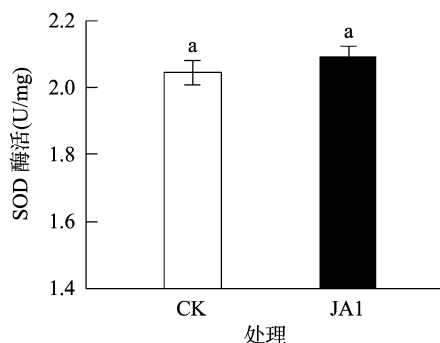


图3 蜗牛 SOD 酶活

3 结论与讨论

蜗牛是农业上的一种害虫,觅食范围非常广泛,可危害豆科、十字花科和茄科蔬菜,以及棉、麻、甘薯、禾谷类作物,桑树、果树等树木;农地中的蜗牛食用农作物的叶、茎、芽、花和多汁的果实,可造成叶片穿透状孔洞、断苗、伤残果等,并传播作物病害,危害蔬菜、花卉、中药材、果树等多种农作物。另外,部分蜗牛品种因为营养丰富,味道鲜美,或者外型适合观赏而被大量人工养殖带来可观的经济效益。目前,我国棉田野生蜗牛品种以灰巴蜗牛与同型巴蜗牛为主。灰巴蜗牛,柄眼目,巴蜗牛科,广泛分布在我国东北、华北、华东、华南、华中、西南、西北等地区。寄生于黄麻、红麻、苧麻、棉花、豆类、玉米、大麦、小麦、蔬菜、瓜类等危害茎叶造成缺刻,严重时咬断嫩苗,造成缺苗断垄^[17-20]。因此,以灰巴蜗牛为代表性研究对象,对于探索转基因棉花对蜗牛的影响有着现实的意义。笔者在野外采集灰巴蜗牛,在实验室对其进行了人工饲养,用于试验。

试验结果表明,直接喂饲转基因棉花叶片的蜗牛与喂饲亲本棉花叶片的蜗牛相比,在进行 72 h 喂饲后,没有出现死亡现象,并且二者对棉叶的取食率也没有显著性差异。表明转基因棉花对蜗牛并没有急性毒性效应。另外,为了保证长期饲养试验的进行,笔者还研发了人工饲料添加棉花叶片粉末喂饲蜗牛的新方法,该方法保证了在非棉花生长期对蜗牛的长期饲养。人工饲料喂饲试验结果表明,72 h 内,喂饲转基因棉花人工饲料的和亲本棉花人工饲料的处理组均未出现

蜗牛死亡现象。喂饲 70 d 的长期试验结果表明,不同处理组之间蜗牛体质量增长趋势一致,相同时期没有显著性差异。单贝取食人工饲料的质量,在不同处理组间也没有显著性差异。72 h 喂饲试验结束后,检测了蜗牛体内的 SOD 酶活性,转基因棉花组与亲本棉花组之间没有显著性差异。

近年来,转基因植物在世界上的种植规模不断扩大,但争议一直存在。我国政府保持着积极研发、慎重推广的态度,这就要求我们的转基因作物环境安全评价工作一定要全面、长期、深入开展。本研究以我国种植面积最大的转基因植物棉花为评价目标,以数量庞大的软体动物门代表性动物蜗牛为研究对象,进行了安全评价工作,为转基因棉花的环境安全评价增添了新数据。

参考文献:

- [1] Giese A C, Pearse J S. Reproduction of marine invertebrates [M]// Molluscs: gastropods and cephalopods. London: Academic Press, 1977: 5-76.
- [2] Markert B, Wappelhorst O, Weckert V, et al. The use of bioindicators for monitoring the heavy-metal status of the environment [J]. Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry, 1999, 240 (2): 425-429.
- [3] Hopkin S P. Ecophysiology of metals in terrestrial invertebrates [J]. Journal of Applied Ecology, 1989, 27 (2): 762-763.
- [4] Coeurdassier M, Vaufléury A G, Badot P. Dose-dependent growth inhibition and bioaccumulation of hexavalent chromium in land snail *Helix aspersa aspersa* [J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 2010, 19 (10): 2571-2578.
- [5] Coughtrey P J, Martin M H. The uptake of lead, zinc, cadmium and copper by the pulmonate mollusk, *Helix aspersa* müller, and its relevance to the monitoring of heavy metal contamination of the environment [J]. Oecologia, 1977, 27 (1): 65-74.
- [6] Coeurdassier M, Gomotde Vaufléury A, Lovy C, et al. Is the cadmium uptake from soil important in bioaccumulation and toxic effects for snails? [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2002, 53 (3): 425-431.
- [7] ISO 15952. Soil quality-effects of pollutants on juvenile land snails (Helicidae) determination of the effects on growth by soil contamination [S]. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland, 2006.
- [8] Saxena D, Flores S, Stotzky G. Bt toxin is released in root exudates from 12 transgenic corn hybrids representing three transformation events [J]. Soil Biology and Biochemistry, 2002, 34: 133-137.
- [9] Tapp h, Stotzky G. Persistence of the insecticidal toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* in soil [J]. Soil Biology and Biochemistry, 1998, 30: 471-476.
- [10] Zwahlen C, Hilbeck A, Gugerli P, et al. Degradation of the Cry1Ab protein within transgenic *Bacillus thuringiensis* corn tissue in the field [J]. Molecular Ecology, 2003, 12: 765-775.
- [11] Valldor P, Miethlinggraff R, Martens R, et al. Fate of the insecticidal Cry1Ab protein of GM crops in two agricultural soils as revealed by ¹⁴C-tracer studies [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2015, 99 (17): 7333-7341.
- [12] Griffiths B S, Caul S, Thompson J, et al. Soil microbial and faunal community responses to maize and insecticide in two soils [J].

王 康,许玉超,戴 辉,等. 沼液在土壤改良上的应用研究[J]. 江苏农业科学,2019,47(24):299-303.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.24.066

沼液在土壤改良上的应用研究

王 康¹,许玉超¹,戴 辉¹,练梅华¹,向新跃²,宗德富³,鞠军华⁴,束剑峰¹

(1. 江苏苏港和顺生物科技有限公司,江苏盐城 224145; 2. 江苏省沿海农业发展有限公司,江苏南京 210000;

3. 盐城市大丰区华丰农业开发有限公司,江苏盐城 224145; 4. 江苏绿洲米业有限公司,江苏盐城 224145)

摘要:为了研究沼液对盐碱地和滩涂的改良效果,在临港产业园从未种植过的土壤上进行沼液喷洒灌溉试验。结果表明,施用 300 t/hm² 鸡粪沼液,能够促进碱蓬和芦苇等植被的生长;0~15 cm 表层土壤和 15~30 cm 深层土壤的容重降低 7.1% 和 3.6%,电导率降低 77.9% 和 75.6%,氯离子含量降低 81.5% 和 78.7%,pH 值增加 2.1% 和 1.7%,有机质含量增加 63.4% 和 72.8%;表层土壤的有效氮、有效磷、速效钾含量分别降低 1.4%、16.1%、5.4%,而深层土壤分别增加 21.6%、12.9%、31.2%;表层土壤中总活菌数、芽孢杆菌数量上升了 1 个数量级,霉菌数量增加了 3 倍,放线菌数量达到 2.0×10^5 CFU/g。

关键词:沼液;盐碱土;改良;滩涂;土壤养分;土壤微生物

中图分类号: S156 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)24-0299-05

大中型沼气工程解决了畜禽粪便处理问题,可实现畜禽粪便的资源化利用,保护环境。沼气发酵的残留物沼渣和沼液是农业上的优良有机肥料,其中沼液中的养分含量占发酵残留物总含量的 85%^[1]。沼液中的养分主要是速效养分,能够被植物快速吸收利用,是一种速缓兼备的液体有机肥^[2]。现有研究表明,沼液中平均约 3/4 的氮为生物有效态氮,生物有效态磷含量占全磷含量的 85% 左右,生物有效态钾含量占全钾含量的 81%;另外,沼液中还含有大量的有机质、氨基酸和腐殖酸等活性物质和有益微生物群^[3],被认为是一种良好的土壤改良剂。

经过多年研究分析得出,沼液在农业应用上的优点主要有以下几个方面:(1)有机质含量高,能够补充土壤的有机质,促进团粒结构的形成,疏松土壤,提高土壤通气、保水保肥

能力;(2)富含氮磷钾大量元素和钙镁硫硼等中微量元素,营养全面,能够调节土壤中各养分含量的比例,降低土壤板结程度,提高植物对养分的均衡吸收能力,增加植物抗性;(3)含有胡敏酸和富里酸等具有高官能团的物质,能够提高土壤缓冲酸碱变化的能力,防止土壤酸化^[4],改良盐碱地^[5];(4)含有多种酶、纤维素、氨基酸、植物激素和腐植酸等活性物质,易于植物吸收,可促进植物生长,增加产量;(5)含有抗生素等生物农药,对农作物的红蜘蛛、黄蜘蛛平均防治率达 90% 以上,可降低农药使用率;(6)调节微生物种类组成和酶活性,抑制有害病原菌的繁殖,加快被固定养分的活化和释放;(7)降低化肥的使用量,从而减少农业的面源污染。

江苏省盐城市虽然耕地面积多,有 7 926 km²,但是主要为 4~7 级低等土壤(土壤养分含量分级表),单位产量低;另外还有 272 km² 荒地和 4 550 km² 滩涂可作为储备资源^[6],但是土壤肥力低,盐碱重,需要改良才可以利用。本研究主要探讨沼液在沿海土壤改良上的应用,以期对荒地及滩涂的利用问题提供一条解决途径,为环境保护提供一些帮助。

1 方法与材料

1.1 试验材料

试验于 2019 年 3 月 1 日至 2019 年 7 月 1 日在江苏省盐

Journal of Environmental Quality,2006,35(3):734-741.

[13] Vaufléury A D, Kramarz P E, Binet P, et al. Exposure and effects assessments of Bt-maize on non-target organisms (gastropods, microarthropods, mycorrhizal fungi) in microcosms [J]. Pedobiologia,2007,51(3):185-194.

[14] Andersen M N, Sausse C, Lacroix B, et al. Agricultural studies of GM maize and the field experimental infrastructure of ECOGEN[J]. Pedobiologia,2007,51(3):175-184.

[15] Kramarz P, Vaufléury A D, Gimbert F. Effects of Bt-maize material on the life cycle of the land snail *Cantareus aspersus* [J]. Applied Soil Ecology,2009,42(3):236-242.

[16] Kramarz P E, De V A, Carey M. Studying the effect of exposure of the snail *Helix aspersa* to the purified Bt toxin, Cry1Ab [J]. Applied Soil Ecology,2007,37(1-2):169-172.

[17] 李洪冉,董向丽,褚 栋. 蜗牛对农作物的危害不容忽视[J]. 中国植保导刊,2015,35(4):88.

[18] 张文斌,任 丽,杨慧平,等. 农田蜗牛的发生规律及其防治技术研究[J]. 陕西农业科学,2012,58(5):267-269.

[19] 徐文华,王瑞明,吴 春,等. 江苏沿海地区农田蜗牛的发生特点与防治对策[J]. 生物安全学报,2002,11(2):63-69.

[20] 王华军. 蜗牛的习性与防治[J]. 蚕桑通报,2002,33(2):53-55.