评述

中国知名大学及研究院所专栏 中国农业科学院植物保护研究所专辑

转 *Bt* 基因植物对蜜蜂的安全性研究进展

王园园, 李云河*, 彭于发

中国农业科学院植物保护研究所, 植物病虫害生物学国家重点实验室, 北京 100193

* 联系人, E-mail: liyunhe@caas.cn

收稿日期: 2015-12-08; 接受日期: 2016-03-17; 网络版发表日期: 2016-05-25

国家转基因生物新品种培育重大专项(批准号: 2014ZX08011-02)资助

摘要 蜜蜂是农业生态系统中重要的传粉昆虫, 也是重要的经济昆虫. 其可通过取食抗虫转基因作物花粉而摄取到外源转基因杀虫蛋白. 因此, 蜜蜂通常作为重要的指示物种用于转基因抗虫作物的环境安全评价工作中. 本文在总结国内外相关研究数据的基础上, 系统分析了抗虫转基因作物的种植对蜜蜂的安全性, 获得以下结论: *Bt* 杀虫蛋白具有较强的杀虫专一性, 当前商业化应用的 *Bt* 杀虫蛋白对蜜蜂没有直接毒性, 因此, 转 *Bt* 基因作物的种植不会对蜜蜂种群及其发挥的重要生态功能产生显著的负面影响. 而早期曾用于植物转基因的蛋白酶抑制剂和植物凝集素对蜜蜂的生长发育及行为具有显著的不利影响, 因此, 表达这类杀虫蛋白的转基因作物应该不会进入商业化应用.

关键词 抗虫转基因作物, 蜜蜂, 杀虫蛋白, 植物花粉, 非靶标影响

重组 DNA 技术的出现打破了不同物种间的遗传隔离, 使植物遗传育种工作取得了巨大发展. 迄今, 国内外已培育出多种抗虫转基因作物, 如抗虫棉花 (*Gossypium hirsutum*)、玉米 (*Zea mays*)、水稻 (*Oryza sativa*)、番茄 (*Lycopersicon esculentum*)、油菜 (*Brassica campestris* L.) 和茄子 (*Solanum melongena* L.) 等^[1,2]. 转入植物中的抗虫基因主要包括: (i) 从细菌中分离出的抗虫基因, 如苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*, *Bt*) 基因; (ii) 从植物体内分离出的抗虫基因, 如雪花莲凝集素 (*Galanthus nivalis agglutinin*, *GNA*) 基因和蛋白酶抑制剂 (protease inhibitor, *PI*) 基因等; (iii) 其他来源于动物或微生物的基因^[3-5]. 目前, 已用于商业化种植的转基因抗虫作物均

表达 *Bt* 基因, 主要包括抗鳞翅目害虫的 *cryI* 和 *cry2* 类基因, 如转 *cryIAb* 基因玉米等和抗鞘翅目害虫的 *cry3* 类基因, 如转 *cry3Bb1* 基因玉米等^[6].

1996 年, 第一例转基因作物开始在美国商业化种植, 当年全球总种植面积仅为 170 万公顷. 随后, 转基因作物种植面积每年增加 8% 左右, 到 2014 年, 全球总种植面积达到 1.815 亿公顷, 其中表现抗虫特性的转基因作物占比超过 40%^[1]. 抗虫转基因作物的种植, 显著降低了化学杀虫剂的施用量, 减少了农业投入成本, 增加了种植者的收入, 同时有效降低了农药对环境的污染, 保护了农田生态环境和生物多样性. 但是, 转基因抗虫作物为人类带来利益的同时, 也可能对生态环境产生负面影响, 因此, 任何一例转

引用格式: 王园园, 李云河, 彭于发. 转 *Bt* 基因植物对蜜蜂的安全性研究进展. 中国科学: 生命科学, 2016, 46: 584–595
Wang Y Y, Li Y H, Peng Y F. Progress in the assessment of ecological effects of insect-resistant *Bt* plants on honey bees. Sci Sin Vitae, 2016, 46: 584–595, doi: 10.1360/N052016-00157

基因作物进入商业化应用前都必须通过严格的安全评价, 其中, 对农田非靶标有益节肢动物的安全性是评价工作的一项重要内容^[7-9].

蜜蜂是农业生态系统中重要的传粉昆虫, 也是重要的经济昆虫, 主要采集作物的花粉、花蜜或酯类物质作为食物, 也可采集由蚜虫等昆虫吸食植物汁液后分泌的蜜露^[2]. 西方蜜蜂(*Apis mellifera* L.)和东方蜜蜂(*Apis cerana* Fabr.)是两种重要的蜜蜂种类, 可以为多种农作物授粉, 经过蜜蜂授粉的农作物产量会显著增加, 产品质量也会得到改善^[10-12]; 同时, 蜜蜂也可为人类提供大量的蜂蜜、王浆等蜂产品. 目前商业化种植的抗虫转基因作物如 *Bt* 棉花和 *Bt* 玉米在花粉中一般都表达外源杀虫蛋白, 这样, 蜜蜂可通过采集和取食植物花粉而摄取到转基因外源杀虫蛋白, 因此, 在转基因抗虫作物的环境安全评价中, 蜜蜂通常作为重要的指示物种进行评价^[13-20].

通常情况下, 评价转基因抗虫作物对非靶标节肢动物的安全性, 一般开展 3 类试验: (i) 纯蛋白饲喂试验, 即将高剂量的、具有生物活性的转基因杀虫蛋白通过人工饲料或其他方式直接饲喂给受试生物, 通过观察受试生物的生长发育参数检测杀虫蛋白对受试生物的潜在直接毒性^[15,21,22]; (ii) 二级营养试验, 对于可以直接取食植物组织(如花粉)的受试生物, 可通过将转基因作物组织直接饲喂给受试生物的方式评价转基因植物对受试生物的潜在影响^[22,23]; (iii) 三级营养试验, 主要用于研究转基因抗虫作物对捕食性和寄生性天敌的潜在影响, 将转基因植物组织或纯杀虫蛋白首先饲喂给受试生物的猎物或寄主, 然后把含转基因杀虫蛋白的猎物或寄主饲喂受试生物, 间接地评价转基因抗虫植物对受试生物的安全性^[24,25]. 蜜蜂作为花粉取食者, 在评价抗虫转基因作物对其影响时, 一般开展纯蛋白饲喂试验和二级营养试验^[26,27]. 本文通过归纳和分析前人研究成果, 明确当前培育和商业化应用的转 *Bt* 基因抗虫作物对蜜蜂的安全性, 旨在为我国转基因抗虫作物环境安全评价和管理提供科学依据.

1 抗虫转基因作物对蜜蜂成虫的安全性

蜜蜂工蜂在蜂群中担任酿蜜、调制蜂粮、泌蜡造脾饲喂蜂王及幼虫、采集花粉和花蜜等工作, 并主要以花粉为食, 而蜂王和雄蜂从幼虫到成蜂均以蜂王

浆为食^[28]. 因此, 工蜂相对雄蜂和蜂王最有可能因为取食抗虫转基因作物花粉而受到负面影响. 另外, 因为蜂王和雄蜂的个体数量较少, 难以用于安全评价试验研究; 而且, 蜜蜂幼虫在蜂巢中生活, 难以像其他昆虫一样可置于不同的容器中开展生物测定试验, 因此, 早期的安全性评价工作主要采用工蜂成蜂为试虫.

1.1 对生长发育的影响

在实验室条件下, 一般通过直接或间接的方式把转基因杀虫蛋白或转基因植物组织饲喂给受试生物, 以不含杀虫蛋白的饲料或非转基因植物组织为对照处理, 通过对比分析不同处理受试生物的生命表参数明确转基因作物对受试生物的安全性. 这是一种传统、简单, 也最为有效的评价转基因作物对受试生物潜在影响的方法.

大量研究表明, 取食混入不同 *Bt* 蛋白(如 Cry1Ba, Cry1Ah, Cry1Ab, Cry1Ac 和 Cry3B 等)对西方蜜蜂或东方蜜蜂没有显著的负面影响^[17,29-34]. 例如, Malone 等人^[30,31]先后进行了两次试验研究了 Cry1Ba 蛋白对西方蜜蜂成虫的影响, 试验中将含混入 10, 2.5, 0.625 及 0.25 mg/g Cry1Ba 杀虫蛋白的花粉饲料饲喂蜜蜂成虫, 并以含有 2.5 mg/g 抑肽酶花粉饲料作为阳性对照. 结果显示, 取食混入 Cry1Ba 蛋白的花粉对蜜蜂存活率、寿命及食物消耗速度均没有显著性影响, 而取食抑肽酶处理的花粉, 蜜蜂存活率显著下降.

蜜蜂工蜂在 6 日龄时王浆腺体开始发育, 10 日龄时王浆腺腺泡直径达到最大, 王浆腺重量在第 12 日时最大^[28,32,33]. 蜜蜂成为哺育蜂后, 可以分泌蜂王浆, 承担着喂养幼虫、蜂王及雄蜂的重任. 王浆腺的发育跟整个蜂群的发展密切相关, 因此, 取食 *Bt* 蛋白是否会影响蜜蜂工蜂王浆腺的发育成了相关研究者关注的问题. Babendreier 等人^[17]将 MON810 玉米花粉、含有 Cry1Ab 纯蛋白的蔗糖溶液(0.0014% w/v)和 2 种浓度的胰蛋白酶抑制剂(soybean trypsin inhibitor, SBTI)蔗糖溶液(0.1%和 1% w/v; 阳性对照)直接饲喂蜜蜂成虫 10 天, 结果发现, 虽然在蜜蜂成虫王浆腺中检测出少量的 *Bt* 蛋白, 但 *Bt* 玉米花粉和 *Bt* 纯蛋白对蜜蜂成虫的存活率及王浆腺的发育均没有显著的负面影响; 相反, 取食了 0.1%和 1% SBTI 的蜜蜂成虫王浆腺平均重量比对照明显降低, 王浆腺腺泡的平

均直径也明显变小,但在蜜蜂王浆腺中并没有检测出 SBTI。

同样,取食抗虫棉花花粉(转 *cryIAc+CpTI* 基因棉花 CCR141、转 *cryIAc* 基因棉 SK-310 和转 *Bt+CpTI* 基因棉花)对西方蜜蜂的寿命及存活率也没有负面影响。另外,李健等人^[35]将中华蜜蜂(*Apis cerana cerana*, 中蜂)成虫释放于种有转 *cryIAb* 油菜的网室内,每 4 天观察蜜蜂的死亡情况,结果表明,取食转 *cryIAb* 油菜花粉对中华蜜蜂的存活率没有影响。Rose 等人^[36]在田间条件下,研究了取食转 *cryIAb* 基因玉米花粉 28 天后的西方蜜蜂体重、觅食能力及蜂群发展情况,同样没有发现显著影响。

以上结果表明,蜜蜂对当前商业化种植的转基因作物表达的 *Bt* 杀虫蛋白不敏感,但是一些蛋白酶抑制剂如 SBTI 会明显抑制蜜蜂的生长发育,因此,表达这类杀虫蛋白的转基因植物不可能进入商业化应用^[3,17,37]。

1.2 对中肠酶活性的影响

中肠内分泌有多种蛋白酶和解毒酶,是昆虫消化吸收的主要场所,也是杀虫蛋白的作用部位。*Bt* 蛋白进入昆虫肠道后,在蛋白酶作用下,原毒素被活化后使中肠膜细胞渗透压发生变化,引起穿孔,最终导致昆虫死亡。有研究表明,昆虫中肠蛋白酶的活性与 *Bt* 蛋白对昆虫的毒性密不可分,如氨肽酶是首个被报道的在 *Bt* 杀虫机制中起重要作用的毒素受体蛋白,而解毒酶在分解外源毒素过程中起重要作用^[38-40]。反之,昆虫取食 *Bt* 蛋白后可能会引起其体内保护酶如过氧化物酶(peroxidase, POD)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)等活性发生变化^[41]。因此,不少研究者把昆虫体内相关蛋白酶的活性作为转基因抗虫作物非靶标效应评价的参数之一。

Han 等人^[42]报道西方蜜蜂取食了转 *cryIAc+CpTI* 棉花花粉 7 天后,其中肠的蛋白水解酶活性与取食非转基因棉花花粉的蜜蜂相比没有显著变化。Liu 等人^[43,44]研究了取食抗虫棉花对西方蜜蜂 SOD 酶活性的影响,发现取食不含花粉的饲料 48 h 后,蜜蜂体内 SOD 活性水平明显高于取食转 *cryIAc* 基因棉 SM-3 或非转基因棉 SK-310 花粉的蜜蜂,但是取食两种棉花花粉的蜜蜂体内 SOD 活性没有显著差异。同样,取食表达 *CryIAc+CpTI* 蛋白的双价抗虫棉花花粉 48 h 后,蜜蜂体内 SOD 活性也没有受到显著影响。然而,

研究发现,取食高浓度两种土豆蛋白酶抑制剂(potato protease inhibitors, POT) POT-1 和 POT-2 后,蜜蜂体内胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、胰肽酶和氨肽酶的活性均明显降低(表 1)^[47]。

1.3 对肠道微生物的影响

经过长期的进化,昆虫与其体内微生物已经建立了密切的联系。蜜蜂消化系统是微生物的一个重要栖息地^[57,58],细菌群落也可以从个体水平和整体水平上反应蜜蜂的健康状况^[37,59]。因此,在评价抗虫转基因作物对蜜蜂的安全性时,蜜蜂消化道内微生物群落也成了研究者关注的一个方面^[37,60]。在蜜蜂消化道微生物研究方面,早期主要集中在致病性微生物方面,而近些年,研究涉及蜜蜂肠道内非病原性微生物群落(如共生菌等)及其对蜜蜂生长发育影响的研究,说明了人们越来越关注肠道微生物对蜜蜂种群发展的重要性(表 1)^[57,61-65]。

分析肠道微生物群落结构最常用的方法是末端限制性酶切片段长度多态性分析(terminal restriction fragment length polymorphism, T-RFLP)技术和变性梯度凝胶电泳(polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis, PCR-DGGE)技术。Babendreier 等人^[37]利用了分子标记技术 T-RFLP 和 PCR 技术分析了西方蜜蜂取食转 *cryIAb* 基因玉米 MON810 花粉和高浓度 *CryIAb* 蛋白后肠道微生物 16S rRNA 片段及末端限制性片段(T-RFs),结果发现,取食 *Bt* 蛋白或 *Bt* 玉米花粉的蜜蜂,肠道内细菌 T-RFs 与取食对照饲料的蜜蜂具有高度的一致性。但是取食了高浓度 SBTI 的蜜蜂肠道内 T-RFs 数量显著减少,并引起蜜蜂的大量死亡。

另外,姜玮瑜研究组^[52,56,66]利用 PCR-DGGE 技术分别研究了取食转 *cryIAc* 基因棉(SGK321)花粉和 *CryIAh* 蛋白对意大利蜜蜂(*Apis mellifera ligustica*, 意蜂)和中蜂肠道细菌群落的影响,DGGE 图谱分析结果显示,在自然条件或人为高选择压力下,取食了转 *cryIAc* 基因棉花花粉或 *CryIAh* 蛋白的蜜蜂与对照相比,其肠道内细菌群落组成相似,无显著差异。另外,为了明确外源基因是否会转移到肠道内微生物细菌 DNA 基因组中,还设计试验将外源 DNA,如质粒 DNA 和线性 DNA 加入饲料中饲喂意蜂和中蜂,结果利用 PCR 方法没有检测到外源 DNA 整合到蜜蜂肠道微生物的基因组中。相反,Hendriksma 等人^[67]利用

表 1 取食转基因杀虫蛋白或抗虫转基因作物花粉对蜜蜂工蜂成虫的安全性

蜜蜂种类	受试蛋白或花粉及剂量	饲料	暴露时间	结果	参考文献
西方蜜蜂 (<i>Apis mellifera</i>)	Cry1Ac: 20 µg/mL	蜂蜜溶液 (50% w/w)	—	对存活率无显著影响	[45]
	Cry3B: 0.066%, 0.332% (w:v)	蔗糖溶液	60	对存活率无显著影响	[29]
	SBTI: 0.001%, 0.01%, 0.1%, 0.5%, 1.0% (w:v)	蔗糖溶液 (60%w:v)	—	SBTI 或 BPTI 浓度为 0.1%, 0.5%, 1.0% 时, 蜜蜂寿命显著缩短	[3]
	BPTI: 0.001%, 0.01%, 0.1%, 0.5%, 1.0% (w:v)	蔗糖溶液 (60%w:v)	8 天	所有处理中氨肽酶活性均显著下降; BPTI 处理中消化酶(胰蛋白酶、胰凝 乳蛋白酶; 弹性蛋白酶)活性均显著 下降;1%的 SBTI 处理的蜜蜂消化酶活 性显著下降	
	SBTI: 0.1%, 0.3%, 1.0% (w:v)	蔗糖溶液 (60%w:v)	8 天	所有处理中氨肽酶活性均显著下降; BPTI 处理中消化酶(胰蛋白酶、胰凝 乳蛋白酶; 弹性蛋白酶)活性均显著 下降;1%的 SBTI 处理的蜜蜂消化酶活 性显著下降	
	BPTI: 0.1%, 0.3%, 1.0% (w:v)	蔗糖溶液 (60%w:v)	8 天	所有处理中氨肽酶活性均显著下降; BPTI 处理中消化酶(胰蛋白酶、胰凝 乳蛋白酶; 弹性蛋白酶)活性均显著 下降;1%的 SBTI 处理的蜜蜂消化酶活 性显著下降	
	Cry2A: 50 µg/mL	果糖溶液 (60% w/w)	—	对存活率无显著影响	[46]
	POT-1: 1%, 0.2% (w:w)	花粉饲料	3, 8 天	1%浓度 POT-1 和 POT-2 处理的蜜蜂 存活率明显降低; POT-2 所有处理消 化酶(胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶; 弹性 蛋白酶)活性均显著下降; 氨肽酶活 性不受影响	[47]
	POT-2: 1%, 0.2% (w:w)	花粉饲料	3, 8 天	1%浓度 POT-1 和 POT-2 处理的蜜蜂 存活率明显降低; POT-2 所有处理消 化酶(胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶; 弹性 蛋白酶)活性均显著下降; 氨肽酶活 性不受影响	
	POT-1: 0.2%, 0.001% (w:v)	蔗糖溶液	3, 8 天	0.2%浓度 POT-1 和 POT-2 处理的蜜蜂 存活率明显降低; POT-2 所有处理及 0.2%POT-1 处理的蜜蜂消化酶(胰蛋 白酶、胰凝乳蛋白酶; 弹性蛋白酶)活 性均显著下降, 0.001%POT-1 处理的 消化酶活性无显著变化; 氨肽酶活性 无显著变化	
	POT-2: 0.2%, 0.001% (w:v)	蔗糖溶液 (60%w:v)	3, 8 天	0.2%浓度 POT-1 和 POT-2 处理的蜜蜂 存活率明显降低; POT-2 所有处理及 0.2%POT-1 处理的蜜蜂消化酶(胰蛋 白酶、胰凝乳蛋白酶; 弹性蛋白酶)活 性均显著下降, 0.001%POT-1 处理的 消化酶活性无显著变化; 氨肽酶活性 无显著变化	
	Cry1Ba: 0.25, 2.5, 10 mg/g	0.33%花粉	7 天	除了 10 mg/g 的 Dipel 处理中蜜蜂存活 率和食物消耗速率明显降低外, 其他 所有处理的蜜蜂存活率、寿命和食物 消耗速率均不受显著影响	[30]
	Dipel 2X: 2.5 mg/g, 10 mg/g	0.08%酪蛋白酸钠	7 天	Cry1Ba: 存活率和飞行能力不受显著 影响;	[31]
	Foray 48B: 2.5 mg/g	0.16%啤酒酵母	7 天	抑肽酶: 存活率显著下降, 从羽化到 首次飞行的时间显著延长	
	SBTI: 0.5, 5, 50 mg/g	0.43%蔗糖和水	7 天	各处理蜜蜂存活率、王浆腺腺泡直径、 腺体重量及腺体内蛋白含量均不受显 著影响	[32]
转 <i>cry1Ab</i> 基因玉米 MON810 转 <i>cry1Ac</i> 基因棉 SK-310	Cry1Ba: 0.625 mg/g	0.33%花粉	10 天	Cry1Ab: 对存活率、王浆腺发育无显 著影响;	[17]
	卵白素: 11.2 µmol/L	0.08%酪蛋白酸钠	10 天	SBTI: 两个处理中蜜蜂存活率均显著 下降, 王浆腺腺泡直径明显减小、腺体 重显著减轻	
	抑肽酶: 2.5 mg/g	0.16%啤酒酵母	10 天	对存活率和王浆腺发育不受显著影响	
	Cry1Ab: 0.0014% (w/v)	蔗糖溶液	10 天	对存活率和王浆腺发育不受显著影响	
	SBTI: 0.1%和 1% (w/v)	(50%w:v)	10 天	对存活率和王浆腺发育不受显著影响	
	转 <i>cry1Ab</i> 基因玉米 MON810	4 g 花粉 25 mL 50%蔗糖溶液	10 天	对存活率和王浆腺发育不受显著影响	
	转 <i>cry1Ac</i> 基因棉 SK-310	0.4, 0.2, 0.1 g/mL (花粉/蔗糖溶液)	1, 2, 4 天	没有急性经口毒性	[43]
		0.4, 0.2, 0.1 g/mL (花粉/蔗糖溶液)	2 天	超氧化物歧化酶(SOD)活性不受显著 影响	
		0.2 g/mL (花粉/蔗糖溶液)	—	取食 Bt 花粉存活 45 天, 非 Bt 花粉 47 天; Bt 花粉不影响蜜蜂寿命	
	SBTI: 0.1%, 0.5%, 1% (w/w)	蔗糖溶液 (40% w/w)	30 天	浓度为 1%时, 王浆腺蛋白含量、中肠 蛋白水解酶活性及存活率均显著下降	[48]

续表 1

蜜蜂种类	受试蛋白或花粉及剂量	饲料	暴露时间	结果	参考文献
西方蜜蜂 (<i>Apis mellifera</i>)	Cry1Ab: 0.0014% (w/v) SBTI: 0.1%, 0.5%, 1% (w/v)	蔗糖溶液 (50%w:v)	10 天	Cry1Ab: 处理中蜜蜂肠道内细菌 T-RFs 与对照显示了高度的一致性; SBTI: 1% 处理的蜜蜂肠道内细菌 T-RFs 数量显著减少, 同时蜜蜂大量死亡	[37]
	转 <i>cry1Ab</i> 基因玉米 MON810	4 g 花粉 25 mL 50%蔗糖溶液	10 天	转基因玉米处理蜜蜂肠道内细菌 T-RFs 与对照高度一致	[36]
	转 <i>cry1Ab</i> 基因玉米	花粉、蜂蜜 (4:1)	35 天	存活率和第 10 天体重均不受显著影响	
			2001 年: 5, 10, 26 天; 2002 年: 7, 4, 21 天	2001 年: Bt 和非 Bt 处理花粉消耗量无显著差异; 2002 年: 非 Bt 处理花粉消耗量显著高于 Bt 处理; 花粉消耗量的多少对蜜蜂体重没有显著影响	[49]
	Cry1Ab: 3 ppb, 5000 ppb	蔗糖溶液 (50% w/w)	7 天	存活率不受显著影响; 取食 5000 ppb Cry1Ab 的蜜蜂食物消耗速率和吻伸反应受到显著影响	
	转 <i>cry1Ac</i> + <i>CpTI</i> 棉花 Zhong-41	0.4, 0.2, 0.1 g/mL (花粉/蔗糖溶液)	1, 2, 4 天	没有急性经口毒性	[44]
		0.4, 0.2, 0.1 g/mL (花粉/蔗糖溶液)	2 天	超氧化物歧化酶(SOD)活性不受显著影响	[50]
		0.2 g/mL (花粉/蔗糖溶液)	—	取食 Bt 花粉存活 49 天, 非 Bt 花粉 46 天; Bt 花粉不影响蜜蜂寿命	
	转 <i>cry1Ac</i> + <i>CpTI</i> 棉花 CCRI41	花粉、蜂蜜、水混合物 (7:1:2)	7 天	存活率不受影响, 花粉消耗量显著降低	[51]
	转 <i>cry1Ac</i> + <i>CpTI</i> 棉花 CCRI41	花粉、蜂蜜、水混合物 (7:1:2)	7 天	Bt 花粉对蜜蜂学习能力无显著影响, 但蜜蜂花粉消耗量显著降低	[52]
	转 <i>cry1Ac</i> 基因棉花 SGK321	蔗糖溶液 (60%w:v)	7 天	中肠细菌群落结构无明显变化	[53]
	转 <i>cry1Ah</i> 基因玉米	蔗糖溶液 (60%w:v)	14 天	中肠细菌群落结构无显著变化	[54]
	Cry1Ah: 1 ng/mL, 10 ng/mL, 10 μg/mL	蔗糖溶液 (60% w/v)	12 天 15 天	王浆腺重量没有显著变化	[54]
			1, 2, 3 天 —	10 μg/mL 处理的蜜蜂吻伸水平显著低于对照 没有急性经口毒性 1 ng/mL: 最长存活 59 天; 10 ng/mL: 56 天; 10 μg/mL: 59 天; 且各处理与对照相比蜜蜂存活率与寿命均无显著性差异	
	转 <i>cry1Ac</i> + <i>CpTI</i> 棉花 CCRI41	花粉、蜂蜜、水混合物 (7:1:2)	7 天	存活率、中肠蛋白酶活性、王浆腺发育及腺体内蛋白含量均不受显著影响	[42]
	转 <i>cry1Ac</i> / <i>cry1Ab</i> 棉花	花粉、蜂蜜、水混合物 (7:1:2)	7 天	存活率、取食能力及血淋巴细胞总数均不受显著影响	[55]
中华蜜蜂 (<i>Apis cerana</i>)	转 <i>cry1Ab</i> 基因油菜	网室试验	10 天	存活率不受影响	[35]
	Cry1Ah: 10 μg/mL, 10 ng/mL, 1 ng/mL	蔗糖溶液 (60%w:v)	12 天	存活率、寿命、花粉消耗、王浆腺重量均不受显著影响	[54]
			1, 2, 3 天 —	没有急性经口毒性 各处理与对照相比蜜蜂存活率与寿命均无显著性差异	[56]
	Cry1Ah 蛋白	蔗糖溶液 (60%w:v)	7 天	中肠细菌群落结构无明显变化	

T-RFLP 技术研究了转 *Bt* 玉米 MON89034xMON-88017(表达 Cry1A.105, Cry2Ab2 和 Cry3Bb1 蛋白)花粉对卡尼鄂拉蜂(*Apis mellifera carnica*, 卡蜂)哺育蜂肠道菌群的影响。结果发现, 取食了 *Bt* 玉米花粉的

蜜蜂与取食非转基因玉米花粉的蜜蜂相比, 肠道内细菌群落差异明显, 但是两个处理的蜜蜂体内优势菌群相同, 即在中肠中变形菌(*Proteobacteria*)为优势种, 后肠中乳杆菌(*Lactobacillus* sp.)和(*Bifidobac-*

表 2 取食转基因杀虫蛋白或抗虫转基因作物花粉对蜜蜂工蜂幼虫的安全性

受试蛋白或花粉及剂量	饲料	暴露时间	结果	参考文献
Cry1Ac: 20 µg/mL	去离子水	—	对幼虫死亡率无显著影响	[45]
Cry2A: 50 µg/mL	去离子水	—	对幼虫死亡率无显著影响	[46]
SBTI: 0.1%, 1.0% w:w	—	至化蛹	取食 SBTI 的幼虫发育时间显著延长, 死亡率明显增加、羽化成虫体重显著减轻	[80]
转 <i>cry1Ac</i> 棉花	蜂箱内 哺育蜂直接饲喂	至化蛹	幼虫和蛹发育历期、4, 5, 6 日龄幼虫体重与对照相比差异不显著; 谷胱甘肽-S-转移酶、总蛋白酶活力不受显著影响, α-乙酸萘酯酶、乙酰胆碱酯酶活力显著升高, 强碱性、弱碱性类胰蛋白酶活力、类胰凝乳蛋白酶活力显著降低	[74]
转 <i>cry1Ab</i> 玉米	蜂箱内 哺育蜂直接饲喂	至化蛹	幼虫和蛹发育历期、4, 5, 6 日龄幼虫体重与对照相比差异不显著; 谷胱甘肽-S-转移酶、总蛋白酶活力不受显著影响, α-乙酸萘酯酶活力显著升高, 乙酰胆碱酯酶、强碱性、弱碱性类胰蛋白酶活力、类胰凝乳蛋白酶活力显著降低	[73]
转豌豆凝集素基因(<i>PSL</i>)油菜 T-17 和 T-132	1.5%花粉/饲料	5 天	对幼虫存活率、发育时间和体重无显著影响	[88]
转 <i>cry1Ab</i> 基因玉米 转基因玉米 Mon89034*Mon88017 (表达 Cry1A.105, Cry2Ab2, CP4)	50%蜂王浆、50%水 溶液(酵母、果糖、葡 萄糖)	5 天	对幼虫死亡率和蛹重无显著性影响	[78]
Cry1Ac	49.5%蜂王浆、36.3% 水、6.8%果糖、6.8% 葡萄糖、1.1%酵母	至化蛹	幼虫存活率、发育时间、羽化后成虫体重和大小均不受显著影响	[86]
转 <i>cry1Ah</i> 玉米	0.5 µg/mL 蜂箱内人工饲喂	至羽化	未成熟期蜜蜂存活率、蜜蜂封盖率、出房率及发育历期均不受显著影响	[75]
Cry1A.105 Cry2Ab2 Cry3Bb1 Cry1A.105+Cry2Ab2+Cry3Bb1 +CP4 EPSPS GNA	50%蜂王浆、50%水 溶液(酵母、果糖、葡 萄糖)	至化蛹	所有处理的蜜蜂幼虫死亡率、蛹重均不受显著影响	[85]
Cry2A: 400 µg/g Cry1C: 50 µg/g SBTI: 1 mg/g	50%蜂王浆、37%水、 8%果糖、4%葡萄糖、 1%酵母	至化蛹	144 h 时, LD50 为 16.3 µg/larva Cry2A 和 Cry1C 处理的幼虫发育历期、存活率、羽化率、老熟幼虫体重、新羽化成虫体重、中肠酶活、肠道细菌群落结构均不受显著影响, 中肠肠膜完整无损; SBTI 处理后老熟幼虫及新羽化成虫体重显著减轻, 肠壁细胞分解, 中肠酶活性也受到显著影响	[87]

terium sp.)为优势种. 有趣的是, 在该研究中发现试验中饲喂过非 *Bt* 玉米花粉的蜜蜂体内竟检测到了 *Bt* 蛋白. 鉴于 *Bt* 蛋白在蜜蜂体内的自然存在及毒理学试验没有发现取食 *Bt* 玉米花粉对蜜蜂的生存率、体重和花粉消化率有显著负面影响, 作者推论, 细菌群落的差异不能说明取食 *Bt* 玉米花粉对蜜蜂具有负面影响^[67].

1.4 对蜜蜂行为的影响

蜜蜂的采集行为、学习行为和取食行为都可能直

接或间接地影响蜜蜂种群的发育. 在化学杀虫剂安全性评价中发现, 杀虫剂可能影响蜜蜂间的舞蹈交流、对食物的访问频率以及采集蜂的回巢能力, 而采集蜂数量的减少, 使得大量哺育蜂成为采集蜂, 从而造成蜜蜂幼虫存活率下降, 最终导致蜜蜂种群的衰败^[68-71]. 那么, 取食 *Bt* 蛋白是否也会影响蜜蜂的行为呢?

大量研究表明, 取食低浓度的纯杀虫蛋白或者转 *Bt* 植物花粉时, 蜜蜂的学习行为及花粉采集能力均不受影响, 但是, 当取食较高浓度杀虫蛋白时, 蜜

蜂吮伸行为和取食行为则会受到显著影响(表 1)^[49,51,54]。例如, 代平礼^[54]研究了 *Cry1Ah* 蛋白对意大利蜜蜂吮伸行为的影响, 当取食浓度分别为 1、10 ng/mL 时, 蜜蜂的吮伸行为并没有发生显著变化, 而当 *Cry1Ah* 蛋白浓度达到 10000 ng/mL 时, 蜜蜂对含 *Cry1Ah* 蛋白的蔗糖溶液的吮伸行为显著低于纯糖水处理。随后, 研究者又在大田网室中研究了转 *cry1Ah* 基因玉米对意蜂行为的影响。结果显示, 取食 *Bt* 玉米和非 *Bt* 玉米花粉的意蜂工蜂群的采集行为(携粉率、采集花粉重量及采集蜂体重)没有显著性差异, 且吮伸试验也没有发现取食转基因玉米对意蜂嗅觉学习行为有负面影响。同样, Ramirez-Romero 等人^[49]给新羽化的西方蜜蜂喂食含不同浓度 *Cry1Ab* 纯蛋白(3 µg/kg, 5000 µg/kg)的饲料后, 发现在摄取了高浓度 *Cry1Ab* 蛋白后, 蜜蜂的取食行为受到显著影响, 表现为与取食对照饲料的蜜蜂相比需要消耗更长的时间吸入食物; 同时, 其学习行为也被干扰, 表现为蜜蜂吮伸反应数明显减少。Han 等人^[50]将转 *cry1Ac*+*CpTI* 棉花(CCRI41)花粉、蜂蜜和水按 7:1:2 比例混合后喂养西方蜜蜂 7 天, 也发现取食转基因棉花花粉的蜜蜂取食行为受到影响, 转基因花粉处理组的花粉消耗量明显比非转基因花粉组减少。但是在随后的中, Han 等人^[51]分别对蜜蜂的视觉和嗅觉学习行为进行观察, 并没有发现 CCRI41 花粉对蜜蜂学习能力有影响。虽然多个研究表明, 取食高剂量的 *Bt* 蛋白可影响蜜蜂的学习和取食行为, 但截至目前, 这种影响的生物学机制及可能带来的生态后果还不清楚。

2 抗虫转基因作物对蜜蜂幼虫的安全性

一般来说, 蜜蜂工蜂幼虫在 1~3 日龄时以蜂王浆为食, 在随后的发育过程中, 其食物中会加入了花粉和蜂蜜。由于没有能力自己选择食物, 蜜蜂工蜂幼虫可能会因取食转基因抗虫作物花粉而持续地摄取到转基因成分^[28,72]。Babendreier 等人^[16]在田间网室内饲养一小群西方蜜蜂幼虫, 只利用开花期玉米植株为蜜蜂提供花粉作为蛋白质来源。然后, 解剖工蜂幼虫, 镜检发现幼虫在排便前其肠道内含有 1720~2310 粒玉米花粉粒, 相当于平均每只幼虫消耗 1.52~2.04 mg 花粉。其中 74.5% 的花粉粒被完全消化, 23.3% 部分消化, 只有 2.2% 没有被消化。这一数据表明, 蜜蜂幼虫通过花粉直接取食的蛋白质占其整个

幼虫生长发育阶段需要蛋白质总量的 5% 左右。该研究为蜜蜂幼虫可通过取食转基因作物花粉而摄取到转基因杀虫蛋白提供了支撑。

由于蜜蜂幼虫难以在蜂巢外饲养, 因此, 传统上抗虫转基因作物对蜜蜂的安全性评价主要集中于成虫阶段, 仅有少量关于评价转基因抗虫作物花粉对蜜蜂幼虫潜在影响的研究。例如, 一些研究者将转基因花粉置于蜂巢或让工蜂在自然条件下采集转基因作物花粉哺育幼虫, 然后观察蜂巢中幼虫的生长发育及其他生命参数。田岩等人^[73,74]将转 *cry1Ac* 棉花和转 *cry1Ab* 玉米花粉置于蜂巢中, 利用哺育蜂将花粉喂给幼虫, 观察和分析意蜂幼虫的生长发育及其他生命参数。结果显示, 在 *Bt* 花粉处理的 6 日龄意蜂幼虫体内均可检测出 *Bt* 蛋白; 取食 *Bt* 花粉和非 *Bt* 花粉的幼虫和蛹发育历期及 4、5 和 6 日龄幼虫体重均没有显著差异。通过对体内几种酶活性进行测定发现, 取食 *Bt* 玉米和 *Bt* 棉花花粉后, 意蜂幼虫体内 α -乙酸萘酯酶(α -NAE)活性明显升高, 强碱、弱碱性胰蛋白酶性显著降低, 然而取食转 *cry1Ac* 棉花花粉的幼虫体内乙酰胆碱酯酶活性极显著高于取食对照花粉的幼虫, 取食转 *cry1Ab* 玉米花粉的幼虫体内该酶的活性却极显著低于取食对照花粉的幼虫。这些影响是源于 *Bt* 蛋白的毒性还是其他环境因素, 该研究中没有阐明。代平礼等人^[75]控制意大利蜜蜂蜂王在空脾上产卵 1 天, 待卵孵化 4 天后用透明塑料纸标记同日龄幼虫巢房位置后, 每天饲喂含有 3 mg 花粉的糖水 6 µL, 其中花粉处理分别为转 *cry1Ah* 玉米花粉、非转基因玉米花粉及蜜蜂采集的杂花粉, 同时蜂群中由哺育蜂直接饲喂的幼虫作为对照, 每天观察幼虫发育情况。结果显示, 取食了转 *cry1Ah* 玉米花粉的幼虫、非转基因玉米花粉及杂花粉的幼虫与哺育蜂自行喂养的幼虫相比, 未成熟期幼虫存活率、封盖率、出房率及发育历期均不受影响。

通过上述方法评价抗虫转基因作物花粉对蜜蜂幼虫的安全性, 试验结果受多方面因素的影响, 很难得出明确的试验结论。为了明确抗虫转基因作物产生的外源杀虫蛋白是否对蜜蜂幼虫具有直接毒性, 最有效的方法是开展纯蛋白直接饲喂试验。早在 20 世纪 90 年代, 有研究者试图将杀虫蛋白如 *Cry1Ac* 或 *Cry2A* 蛋白等溶入水中饲喂蜜蜂幼虫, 结果发现取食 *Bt* 蛋白的幼虫存活率与对照处理幼虫没有显著差异^[45,46]。但是, 由于蜜蜂幼虫阶段主要以蜂王浆、花

粉和蜂蜜为食, 以水作为载体不能满足幼虫的生长发育所需的营养, 这会导致对照处理幼虫死亡率较高, 试验结果的可靠性较低. 近年来, 蜜蜂幼虫的人工饲料配方和离巢饲养技术得到了有效改进^[76-80], 这为评价抗虫转基因作物外源杀虫蛋白对蜜蜂幼虫的直接影响提供了便利.

Aupinel 等人^[81]发展的人工饲料由 50% 的蜂王浆和 50% 的水溶液组成, 其中水溶液中溶质为蔗糖和酵母浸提物, 并研究了不同饲喂方式、不同饲料配比及每天提供给幼虫的饲料量对幼虫死亡率等生命表参数的影响, 最终获得了一种最优饲喂体系: 在饲喂蜜蜂幼虫过程中, 蔗糖和酵母浸提物的比例及饲喂幼虫的饲料用量均会随饲养时间变化而不同: 每只蜜蜂幼虫在第 1 天提供 20 μL 饲料(24%蔗糖、2%酵母浸提物); 第 3 天 20 μL 饲料(30%、3%); 第 4~6 天分别为 30, 40, 50 μL 饲料(36%, 4%), 并利用这一饲料及饲养技术研究了化学农药对蜜蜂幼虫的毒性^[82,83].

Hendriksma 等人^[84]在 Aupinel 等人^[81]研究基础上对饲料配方进行了改进, 将蔗糖换成果糖和葡萄糖, 并通过改变两者比例来适应幼虫不同发育阶段的营养需要. 随后, Hendriksma 等人^[78]将表达 Cry1Ab 蛋白的转基因玉米 DKc7565、表达 2 种抗虫基因和一种耐除草剂基因的转基因玉米 Mon89034*Mon88017 花粉按照 100 mg/mL 的浓度加入到第 6 天的幼虫饲料中. 结果发现, 取食转基因玉米花粉对幼虫存活率和预蛹体重均没有影响. 同时, 研究了 GNA 和纯 *Bt* 蛋白(Cry1A, Cry2Ab2, Cry3Bb1)对蜜蜂幼虫的影响, 发现无论是取食单一 *Bt* 蛋白还是不同 *Bt* 蛋白的混合对蜜蜂幼虫的存活率和预蛹体重均无负面影响, 而 GNA 对蜜蜂幼虫具有毒性, 在 144 h 时的 LD_{50} 为 16.3 μg /幼虫^[85].

Lima 等人^[86]采用 Silva 等人^[77]所描述的蜜蜂幼虫人工饲料(49.5%蜂王浆、36.3%水、6.8%果糖、6.8%葡萄糖及 1.1%酵母浸提物)及饲喂技术, 研究了 Cry1Ac 蛋白对西方蜜蜂幼虫的安全性. 试验中 Cry1Ac 浓度相当于蜜蜂在田间可能摄取到的最高估计浓度, 幼虫取食加入了 Cry1Ac 蛋白的人工饲料 5 天后, 其存活率、发育时间、羽化后成虫体重及大小均未受到显著影响^[86].

最近, 中国农业科学院植物保护研究所彭于发研究组^[87]基于国际上公开发表的蜜蜂全人工饲料配方(50%蜂王浆、37%水、8%果糖、4%葡萄糖及 1%

酵母浸提物)^[79], 发展了评价转基因杀虫蛋白对蜜蜂幼虫潜在毒性影响的技术体系, 并选择 SBTI 作为阳性对照验证了试验体系的有效性和敏感性. 采用该试验体系, Wang 等人^[87]将 Cry1C (50 $\mu\text{g/g}$)和 Cry2A (400 $\mu\text{g/g}$)蛋白分别加入到人工饲料中直接饲喂给意大利蜜蜂 2 日龄幼虫, 研究了两种 *Bt* 蛋白对意蜂幼虫的潜在影响. 两种 Cry 蛋白的浓度均为相应转基因抗虫水稻花粉中 Cry 蛋白浓度的 10 倍以上. 结果显示, 分别取食了含有两种 *Bt* 蛋白的蜜蜂幼虫与取食纯人工饲料的蜜蜂相比, 其存活率、化蛹率、羽化率、老熟幼虫体重等生命表参数无显著差异; 6 日龄幼虫肠道内总蛋白酶、类胰蛋白酶、氨肽酶及 α -乙酸酯酶活性也没有发生显著变化; 肠道内细菌群落结构也未受显著影响; 组织切片显示幼虫中肠表皮膜没有受到破坏. 这些结果说明, Cry1C 及 Cry2A 蛋白对意大利蜜蜂幼虫没有毒性. 然而, 取食阳性化合物 SBTI 的蜜蜂生命参数受到显著的负面影响^[87].

除了 *Bt* 蛋白, 其他杀虫蛋白如 GNA, SBTI 等对蜂类幼虫的毒性影响也受到研究者的关注. 例如, Brødsgaard 等人^[80]将 SBTI 分别按 0.1%和 1.0%(w:w)加入半人工饲料中饲喂西方蜜蜂幼虫至成虫, 结果高剂量 SBTI 使幼虫生长发育显著减慢, 死亡率明显上升, 羽化的成虫体重显著减轻; 但在低剂量下, 取食 SBTI 对蜜蜂幼虫生长发育并没有显著不利影响. 还有研究发现, 转豌豆凝集素基因(*PSL*)油菜(T-17 和 T-132)花粉对蜜蜂幼虫的死亡率、发育时间、体重没有显著的负面影响(表 2)^[88].

3 小结

本文通过对已发表的研究数据进行归纳和系统分析, 可得到以下结论: 当前已商业化应用的 *Bt* 杀虫蛋白对靶标害虫具有较强的专一性, 对蜜蜂幼虫和成虫都没有直接的毒性作用. Duan 等人^[15]对 25 个 *Bt* 蛋白对蜜蜂存活率影响的研究数据进行了系统分析, 结果同样表明, 目前培育的转基因作物所表达的 Cry 蛋白如 Cry1A, Cry1F, Cry1Ba, Cry2A, Cry3A, Cry3B, Cry9C 等, 对西方蜜蜂幼虫和成虫的生长发育不会产生显著的负面影响. 但是, 一些研究发现, 当蜜蜂取食极高剂量 *Bt* 蛋白时, 蜜蜂的学习行为如吮伸反应或取食行为会受到一定的干扰^[49,54]; 也有研究表明, 取食抗虫棉花花粉也会在一定程度上影响

蜜蜂的取食行为^[50]。截至目前,产生这种影响的机制及这种影响对蜜蜂种群的发展及其在农田发挥的传粉功能是否会带来负面的影响还不清楚。另外,考虑到转 *Bt* 作物花粉中杀虫蛋白的表达量较低,蜜蜂在自然条件下取食到 *Bt* 杀虫蛋白的水平很低,因此,转 *Bt* 作物的种植对蜜蜂的影响可能微乎其微。

与 *Bt* 蛋白不同,曾经用于转基因植物的蛋白酶抑制剂和植物凝集素的杀虫特性不够专一,取食较高浓度蛋白酶抑制剂和雪花莲凝集素对蜜蜂成虫和

幼虫都会产生不利影响(表 1 和 2)^[37,47,77]。除了蜜蜂,蛋白酶抑制剂如 E-64 也对其其他有益节肢动物如捕食性瓢虫等具有毒性作用^[89]。因此,转蛋白酶抑制剂和植物凝集素基因的植物可能不会进入商业化应用。

本文通过对国内外有关转基因抗虫作物及杀虫蛋白对蜜蜂的安全性研究进行总结和分析,相关数据及结论可为今后的相关研究提供参考,并为我国转基因抗虫作物研发、应用及安全管理提供依据。

参考文献

- James C. Global status of commercialized biotech/GM Crops: 2014. ISAAA Brief NO. 49. Ithaca, NY: ISAAA, 2014
- Malone L A, Gatehouse A M R, Barratt B I P. Beyond *Bt*: alter-native strategies for insect-resistant genetically modified crops. In: Romeis J, Shelton A M, Kennedy G G, eds. *Intergation of Insect-Resistant Genetically Modified Crops With IPM Programs*. Berlin; Springer, 2008. 357–417
- Burgess E P, Malone L A, Christeller J T. Effects of two proteinase inhibitors on the digestive enzymes and survival of honey bees (*Apis mellifera*). *J Insect Physiol*, 1996, 42: 823–828
- 林良斌, 官春云. *Bt* 毒蛋白基因与植物抗虫基因工程. *生物工程进展*, 1997, 17: 51–55
- 崔洪志, 郭三堆. *Bt* 毒蛋白抗虫植物基因工程研究. *农业生物技术学报*, 1998, 6: 166–172
- Yu H L, Li Y H, Wu K M. Risk assessment and ecological effects of transgenic *Bacillus thuringiensis* crops on non-target organisms. *J Integr Plant Biol*, 2011, 53: 520–538
- Romeis J, Bartsch D, Bigler F, et al. Assessment of risk of insect-resistant transgenic crops to nontarget arthropods. *Nat Biotechnol*, 2008, 26: 203–208
- Wolfenbarger L L, Phifer P R. The ecological risks and benefits of genetically engineered plants. *Science*, 2000, 290: 2088–2093
- 王园园, 李云河, 陈秀萍, 等. 抗虫转基因植物对非靶标节肢动物生态影响的研究进展. *生物安全学报*, 2011, 2: 100–107
- 刘艳荷, 陈盛禄. 转抗虫基因植物对蜜蜂的影响. *昆虫知识*, 2001, 38: 258–262
- 张金振, 赵静, 吴黎明, 等. 转基因作物对蜂产品的影响及其检测方法. *中国蜂业*, 2010, 61: 41–44
- 王瀛寰, 张艳峰, 张旭, 等. 五种农药对中华蜜蜂和意大利蜜蜂工蜂的经口毒性比较. *农药学报*, 2012, 14: 453–456
- Malone L, Burgess E P J, Gatehouse H S, et al. Effects of ingestion of a *Bacillus thuringiensis* toxin and a trypsin inhibitor on honey bee flight activity and longevity. *Apidologie*, 2001, 32: 57–68
- Malone L. Literature review on genetically modified plants and bee products. New Zealand: Hort Research, 2002
- Duan J J, Marvier M, Huesing J, et al. A meta-analysis of effects of *Bt* crops on honey bees (Hymenoptera: Apidae). *PLoS One*, 2008, 3: e1415
- Babendreier D, Kalberer N, Romeis J, et al. Pollen consumption in honey bee larvae: a step forward in the risk assessment of transgenic plants. *Apidologie*, 2004, 35: 293–300
- Babendreier D, Kalberer N M, Romeis J, et al. Influence of *Bt*-transgenic pollen, *Bt*-toxin and protease inhibitor (SBTI) ingestion on development of the hypopharyngeal glands in honeybees. *Apidologie*, 2005, 36: 585–594
- Henry M, Beguin M, Requier F, et al. A common pesticide decreases foraging success and survival in honey bees. *Science*, 2012, 336: 348–350
- Mommaerts V, Jans K, Smagghe G. Impact of *Bacillus thuringiensis* strains on survival, reproduction and foraging behaviour in bumblebees (*Bombus terrestris*). *Pest Manag Sci*, 2010, 66: 520–525
- Garcia-Alonso M, Jacobs E, Raybould A, et al. A tiered system for assessing the risk of genetically modified plants to non-target organisms. *Environ Biosafety Res*, 2006, 5: 57–65
- Romeis J, Dutton A, Bigler F. *Bacillus thuringiensis* toxin (Cry1Ab) has no direct effect on larvae of the green lacewing *Chrysoperla carnea* (Stephens) (Neuroptera: Chrysopidae). *J Insect Physiol*, 2004, 50: 175–183
- Li Y, Meissle M, Romeis J. Consumption of *Bt* maize pollen expressing Cry1Ab or Cry3Bb1 does not harm adult green lacewings, *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: Chrysopidae). *PLoS One*, 2008, 3: e2909

- 23 Wang Y, Li Y, Romeis J, et al. Consumption of *Bt* rice pollen expressing Cry2Aa does not cause adverse effects on adult *Chrysoperla sinica* Tjeder (Neuroptera: Chrysopidae). *Biol Control*, 2012, 61: 246–251
- 24 Li Y H, Romeis J. *Bt* maize expressing Cry3Bb1 does not harm the spider mite, *Tetranychus urticae*, or its ladybird beetle predator, *Stethorus punctillum*. *Biol Control*, 2010, 53: 337–344
- 25 Romeis J, Hellmich L R, Candolfi M P, et al. Recommendations for the design of laboratory studies on non-target arthropods for risk assessment of genetically engineered plants. *Transgenic Res*, 2011, 20: 1–22
- 26 Romeis J, Meissle M, Bigler F. Transgenic crops expressing *Bacillus thuringiensis* toxins and biological control. *Nat Biotechnol*, 2006, 24: 63–71
- 27 Li Y H, Romeis J, Wu K M, et al. Tier-I assays for assessing the toxicity of insecticidal proteins produced by genetically engineered plants to non-target arthropods. *Insect Sci*, 2014, 21: 125–134
- 28 吴杰. 现代农业科技专著大系: 蜜蜂学. 北京: 中国农业出版社, 2012. 14–15
- 29 Arpaia S. Ecological impact of *Bt*-transgenic plants: 1 Assessing possible effects of Cry3B toxin on honey bee (*Apis mellifera* L.) colonies. *J Genet Breed*, 1996, 50: 315–319
- 30 Malone L A, Burgess E P J, Stefanovic D. Effects of a *Bacillus thuringiensis* toxin, two *Bacillus thuringiensis* bio-pesticide formulations and a soybean trypsin inhibitor on honeybee (*Apis mellifera* L.) survival and food consumption. *Apidologie*, 1999, 30: 465–473
- 31 Malone L A, Burgess, E P J, Gatehouse, H S, et al. Effects of ingestion of a *Bacillus thuringiensis* toxin and a trypsin inhibitor on honey bee flight activity and longevity. *Apidologie*, 2001, 32: 57–68
- 32 Malone L A, Todd J H, Burgess E P J, et al. Development of hypopharyngeal glands in adult honey bees fed with a *Bt* toxin, a biotin-binding protein and a protease inhibitor. *Apidologie*, 2004, 35: 655–664
- 33 Dai P L, Zhou W, Zhang J, et al. The effects of *Bt* Cry1Ah toxin on worker honeybees (*Apis mellifera ligustica* and *Apis cerana cerana*). *Apidologie*, 2012, 43: 384–391
- 34 Dai P L, Zhou W, Zhang J, et al. Field assessment of *Bt cry1Ah* corn pollen on the survival, development and behavior of *Apis mellifera ligustica*. *Ecotox Environ Safe*, 2012, 79: 232–237
- 35 李健, 官春云, 李杓, 等. 转 *Bt* 基因抗虫油菜花粉对蜜蜂生存的影响. *中国油料作物学报*, 2003, 25: 78–79
- 36 Rose R, Dively G P, Pettis J. Effects of *Bt* corn pollen on honey bees: emphasis on protocol development. *Apidologie*, 2007, 38: 368–377
- 37 Babendreier D, Joller D, Romeis J, et al. Bacterial community structures in honeybee intestines and their response to two insecticidal proteins. *FEMS Microbiol Ecol*, 2007, 59: 600–610
- 38 Oppert B, Kramer K J, Johnson D, et al. Luminal proteinases from *Plodia interpunctella* and the hydrolysis of *Bacillus thuringiensis* CryIA(c) protoxin. *Insect Biochem Molec*, 1996, 26: 571–583
- 39 Gunning R. New resistance mechanism in *Helicoverpa armigera* threatens transgenic crops expressing *Bacillus thuringiensis cry1Ac* toxin. *Appl Environ Microb*, 2005, 71: 2558–2563
- 40 Yang Y. Introgression of a disrupted cadherin gene enables susceptible *Helicoverpa armigera* to obtain resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac. *B Entomol Res*, 2009, 99: 175–181
- 41 蒋晴, 苏宏华, 杨益众. 昆虫对 *Bt* 毒素的抗性与其肠蛋白酶、解毒酶及保护酶系活性的关系. *环境昆虫学报*, 2013, 1: 95–101
- 42 Han P, Niu C Y, Biondi A, et al. Does transgenic Cry1Ac+CpTI cotton pollen affect hypopharyngeal gland development and midgut proteolytic enzyme activity in the honey bee *Apis mellifera* L. (Hymenoptera, Apidae)? *Ecotoxicology*, 2012, 21: 2214–2221
- 43 Liu B, Xu C, Yan F, et al. The impacts of the pollen of insect-resistant transgenic cotton on honeybees. *Biodivers Conserv*, 2005, 14: 3487–3496
- 44 Liu B, Shu C, Xue K, et al. The oral toxicity of the transgenic *Bt+CpTI* cotton pollen to honeybees (*Apis mellifera*). *Ecotoxicol Environ Saf*, 2009, 72: 1163–1169
- 45 Sims S R. *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (Cry1Ac) protein expressed in transgenic cotton: effects on beneficial and other nontarget insects. *Southwest Entomol*, 1995, 20: 493–500
- 46 Sims S R. Host activity spectrum of the CryIIA *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* protein: effects on lepidoptera, diptera, and non-target arthropods. *Southwest Entomol*, 1997, 22: 395–404
- 47 Malone L A, Burgess E P, Christeller J T, et al. *In vivo* responses of honey bee midgut proteases to two protease inhibitors from potato. *J Insect Physiol*, 1998, 44: 141–147
- 48 Sagili R R, Pankiw T, Zhu-Salzman K. Effects of soybean trypsin inhibitor on hypopharyngeal gland protein content, total midgut protease activity and survival of the honey bee (*Apis mellifera* L.). *J Insect Physiol*, 2005, 51: 953–957.
- 49 Ramirez-Romero R, Desneux N, Decourtye A, et al. Does Cry1Ab protein affect learning performances of the honey bee *Apis mellifera*

- L. (Hymenoptera, Apidae)? Ecotox Environ Safe, 2008, 70: 327–333
- 50 Han P, Niu C Y, Lei C L, et al. Quantification of toxins in a Cry1Ac+CpTI cotton cultivar and its potential effects on the honey bee *Apis mellifera* L. Ecotoxicology, 2010, 19: 1452–1459
- 51 Han P, Niu C Y, Lei C L, et al. Use of an innovative T-tube maze assay and the proboscis extension response assay to assess sublethal effects of GM products and pesticides on learning capacity of the honey bee *Apis mellifera* L. Ecotoxicology, 2010, 19: 1612–1619
- 52 姜玮瑜, 代平礼, 张永军, 等. 转 *Bt-cryIAc* 基因棉花对意大利蜜蜂肠道细菌群落的影响. 应用与环境生物学报, 2010, 2: 211–215
- 53 崔红娟. 转 *cryIAb* 基因玉米对蜜蜂中肠细菌群落和土壤微生物群落的影响. 硕士学位论文. 哈尔滨: 东北农业大学, 2011
- 54 代平礼. 转 *Bt cryIAb* 基因玉米对蜜蜂的安全性研究. 博士学位论文. 北京: 中国农业科学院, 2011
- 55 Niu L, Ma Y, Mannakkara A, et al. Impact of single and stacked insect-resistant *Bt*-cotton on the honey bee and silkworm. PLoS ONE, 2013, 8: e72988
- 56 Jiang W Y, Geng L L, Dai P L, et al. The influence of *Bt*-transgenic maize pollen on the bacterial diversity in the midgut of Chinese honeybees, *Apis cerana cerana*. J Integr Agr, 2013, 12: 474–482
- 57 Disayathanoowat T, Young J P, Helgason T, et al. T-RFLP analysis of bacterial communities in the midguts of *Apis mellifera* and *Apis cerana* honey bees in Thailand. FEMS Microbiol Ecol, 2012, 79: 273–281
- 58 相辉, 李木旺, 赵勇, 等. 家蚕幼虫中肠细菌群落多样性的 PCR-DGGE 和 16S rDNA 文库序列分析. 昆虫学报, 2007, 50: 222–233
- 59 Mohr K I, Tebbe C C. Diversity and phylotype consistency of bacteria in the guts of three bee species (Apoidea) at an oilseed rape field. Environ Microbiol, 2006, 8: 258–272
- 60 Sabree Z L, Hansen A K, Moran N A. Independent studies using deep sequencing resolve the same set of core bacterial species dominating gut communities of honey bees. PLoS One, 2012, 7: e41250
- 61 Alippi A M, López A C, Aguilar O M. Differentiation of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*, the cause of American foulbrood of honeybees, by using PCR and restriction fragment analysis of genes encoding 16S rRNA. Appl Environ Microb, 2002, 68: 3655–3660
- 62 Dillon R, Dillon V. The gut bacteria of insects: nonpathogenic interactions. Annu Rev Entomol, 2004, 49: 71–92
- 63 Martinson V G, Moy J, Moran N A. Establishment of characteristic gut bacteria during development of the honeybee worker. Appl Environ Microbiol, 2012, 78: 2830–2840
- 64 Moran N A, Hansen A K, Powell J E, et al. Distinctive gut microbiota of honey bees assessed using deep sampling from individual worker bees. PLoS One, 2012, 7: e36393
- 65 Vojvodic S, Rehan S M, Anderson K E. Microbial gut diversity of Africanized and European honey bee larval instars. PLoS One, 2013, 8: e72106
- 66 Geng L L, Cui H J, Dai P L, et al. The influence of *Bt*-transgenic maize pollen on the bacterial diversity in the midgut of *Apis mellifera ligustica*. Apidologie, 2013, 44: 198–208
- 67 Hendriksma H P, Küting M, Härtel S, et al. Effect of stacked insecticidal Cry proteins from maize pollen on nurse bees (*Apis mellifera carnica*) and their gut bacteria. PLoS One, 2013, 8: e59589
- 68 Stephen W P, Schricker B. The effect of sublethal doses of parathion II site of parathion activity, and signal integration. J Apicult Res, 1970, 9: 155–164
- 69 Schricker B, Stephen W P. The effect of sublethal doses of parathion on honeybee behaviour. I. Oral administration and communication dance. J Apicult Res, 1970, 9: 141–153
- 70 Guez D, Zhang S W, Srinivasan M V. Methyl parathion modifies foraging behaviour in honeybees (*Apis mellifera*). Ecotoxicology, 2005, 14: 431–437
- 71 Halm M P, Rortais A, Arnold G, et al. New risk assessment approach for systemic insecticides: the case of the honey bees and imidacloprid (Gaucho). Environ Sci Technol, 2006, 40: 2448–2454
- 72 van der Steen J J. Review of the methods to determine the hazard and toxicity of pesticides to bumblebees. Apidologie, 2001, 32: 399–406
- 73 田岩, 张永军, 吴孔明, 等. 转 *Bt-cryIAb* 玉米花粉对意大利蜜蜂生长发育及体内酶活性的影响. 农业生物技术学报, 2006, 14: 990–991
- 74 田岩, 张永军, 吴孔明, 等. 转 *Bt-cryIAc* 棉花花粉对意大利蜜蜂生长发育的影响. 应用与环境生物学报, 2006, 12: 464–467
- 75 代平礼, 周玮, 张杰, 等. 转 *Bt-cryIAb* 基因玉米花粉对意大利蜜蜂幼虫的影响. 应用昆虫学报, 2012, 49: 1140–1146
- 76 Patel N, Haydak M, Gochnauer T. Electrophoretic components of the proteins in honeybee larval food. Nature, 1960, 186: 633–634
- 77 Silva I C, Message D, Cruz C D, et al. Rearing Africanized honey bee (*Apis mellifera* L.) brood under laboratory conditions. Genet Mol Res, 2009, 8: 623–629
- 78 Hendriksma H P, Härtel S, Steffan-Dewenter I. Testing pollen of single and stacked insect-resistant *Bt*-maize on *in vitro* reared honey bee

- larvae. PLoS One, 2011, 6: e28174
- 79 Huang Z Y. A standardized procedure for *in vitro* rearing of honey bee larvae. Sacramento: California Department of Agriculture, 2009
- 80 Brødsgaard H F, Brødsgaard C J, Henrikand H, et al. Environmental risk assessment of transgene products using honey bee (*Apis mellifera*) larvae. Apidologie, 2003, 34: 139–145
- 81 Aupinel P, Fortini D, Dufour H, et al. Improvement of artificial feeding in a standard *in vitro* method for rearing *Apis mellifera* larvae. B Insectol, 2005, 58, 107–111
- 82 Aupinel P, Fortini D, Michaud B, et al. Toxicity of dimethoate and fenoxycarb to honey bee brood (*Apis mellifera*), using a new *in vitro* standardized feeding method. Pest Manag Sci, 2007, 63, 1090–1094
- 83 Aupinel P, Fortini D, Michaud B, et al. Honey bee brood ring-test: method for testing pesticide toxicity on honeybee brood in laboratory conditions. Julius-Kühn-Archiv, 2010, 423: 96–102
- 84 Hendriksma H P, Härtel S, Steffan-Dewenter I. Honey bee risk assessment: new approaches for *in vitro* larvae rearing and data analyses. Methods Ecol Evol, 2011, 2: 509–517
- 85 Hendriksma H P, Härtel S, Babendreier D, et al. Effects of multiple *Bt* proteins and GNA lectin on *in vitro*-reared honey bee larvae. Apidologie, 2012, 43: 549–560
- 86 Lima M A P, Pires C S S, Guedes R N C, et al. Does Cry1Ac *Bt*-toxin impair development of worker larvae of Africanized honey bee? J Appl Entomol, 2011, 135: 415–422
- 87 Wang Y Y, Li Y H, Huang Z Y, et al. Toxicological, biochemical, and histopathological analyses demonstrating that Cry1C and Cry2A are not toxic to larvae of the honeybee, *Apis mellifera*. J Agr Food Chem, 2015, 63: 6126–6132
- 88 Lehrman A. Does pea lectin expressed transgenically in oilseed rape (*Brassica napus*) influence honey bee (*Apis mellifera*) larvae? Environ Biosafety Res, 2007, 6: 271–278
- 89 Zhang X, Li Y, Romeis J, et al. Use of a pollen-based diet to expose the ladybird beetle *Propylea japonica* to insecticidal proteins. PLoS One, 2014, 9: e85395

Progress in the Assessment of Ecological Effects of Insect-Resistant *Bt* Plants on Honey Bees

WANG Yuan-Yuan, LI Yun-He & PENG Yu-Fa

State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China

Honey bees are important pollinators in the agro-ecosystems, meanwhile they are important economic insects. Since they are exposed to insecticidal proteins when feeding insect-resistant genetically modified (IRGM) plant pollen, honey bees are usually selected as a surrogate species in environmental safety assessment of IRGM plants. Here we summarized and analyzed the previous data regarding the potential effects of feeding pure insecticidal proteins or IRGM pollen on honey bees, and a general conclusion is made that the commercially used *Bt* proteins are very specific to target pests, and these proteins have no direct toxicity to honey bees. Therefore, planting of *Bt* crops will not significantly affect populations and ecological functions of honey bees. However, the protease inhibitors and plant lectins that had been used for plant transformation in early time have detrimental effects on the survival, development and behavior of honey bees, therefore we conclude that plants expressing such insecticidal proteins may not be commercially planted.

insect-resistant genetically modified crop, honey bee, insecticidal protein, plant pollen, non-target effect

doi: 10.1360/N052016-00157