Bt 水稻 Cry1Ab 杀虫蛋白表达的时间动态 及其在水稻土中的降解

白耀宇1,2,蒋明星1,程家安1*

(1. 浙江大学应用昆虫学研究所,杭州 310029;2. 西南农业大学植物保护学院,

重庆市昆虫学与害虫控制工程重点实验室,重庆 400716)

摘要:采用 ELISA 技术检测了 Bt 水稻克螟稻 1 号(KMD1)和克螟稻 2 号(KMD2)不同生育期茎和叶片中 cry1Ab 基因的表达 水平,以及植株组织(茎和叶片)室内埋于不同稻田土壤中其 Cry1Ab 杀虫蛋白的降解动态。结果表明,不论是 KMD1 还是 KMD2,茎和叶片中 cry1Ab 基因的表达量为 3.7~9.1µg/g 鲜重,均以拔节期和孕穗期相对较低,灌浆初期显著升高,黄熟期又 明显下降(但仍然维持在较高的表达量)。KMD1 茎和叶片中 Cry1Ab 蛋白在 3 种水稻土即青紫泥田、黄松田和黄筋泥田中的降 解,均以前期(处理后 12d 内)较快,但中后期明显较慢;处理后 42d,这两种组织中的 Cry1Ab 残留量均稳定在 µg 级水平,分别 仅有 0.20~0.85µg/g 千重和 0.35~1.81µg/g 干重。KMD1 茎和叶片中 Cry1Ab 蛋白降解动态与土壤类型密切相关,青紫泥田 中降解最快,黄筋泥田中次之,黄松田中最慢。淹水可加快土壤中茎和叶的腐解,从而促进其中 Cry1Ab 蛋白的降解。KMD2 粉 碎叶中 Cry1Ab 蛋白在有菌水稻土中的降解快于无菌土中,表明土壤微生物存在可加快 Cry1Ab 蛋白的降解。在各种土壤淹水 与非淹水、灭菌与非灭菌处理条件下的 Cry1Ab 蛋白降解的可能机制,认为土壤微生物是其中起关键作用的一个因子。 关键词:Bt 水稻;Cry1Ab 杀虫蛋白;表达;水稻土;降解 文章编号:1000-0933(2005)07-1583-08 中图分类号,Q968 文献标识码:A

Temporal expression patterns of Cry1Ab insecticidal protein in Bt rice plants and its degradation in paddy soils

BAI Yao-Yu^{1,2}, JIANG Ming-Xing¹, CHENG Jia-An^{1*} (1. Institute of Applied Entomology, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China; 2. Plant Protection College, Southwest Agricultural University, Chongqing Key Laboratory of Entomology & Insect Control Engineering, Chongqing 400716, China). Acta Ecologica Sinica, 2005, 25(7): 1583~1590.

Abstract: Bt (Bacillus thuringiensis) toxins produced in insect-resistant transgenic Bt crops can enter soils in the forms of plant residues, root exudates and pollens, posing potential risks to beneficial organisms in the soil. Active Bt toxins may be bound to certain types of soil and persist there for a long period of time. In the present study, seasonal expression patterns of Bt cry1Ab in plant tissues of Bt rice were observed, and then by burying the plant tissues highly expressing Cry1Ab into soils, degradation patterns of Cry1Ab in different types of soils, as well as the effects of flooding and microorganisms on its degradation, were determined. Thirty-day-old plants of transgenic rice lines, KMD1 and KMD2, and their parent non-transgenic cv. Xiushui 11 (japonica rice), were transplanted in a greenhouse of Huajiachi campus of Zhejiang University in mid-

May. At jointing, booting, early milking and maturing stages, stems and leaf blades of KMD1 and KMD2 were sampled

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30070500)

收稿日期:2004-10-13;修订日期:2005-04-10

作者简介:白耀宇(1970~),男,甘肃白银人,博士,主要从事昆虫生态学和生物安全评价研究。E-mail:yybai2001@yahoo. com.cn

致谢:承蒙浙江大学环境资源学院马国瑞教授、李庭轩博士和徐建明教授在土壤理化特性测定及其种类鉴定等方面给予热情指导;浙江大学核 农所舒庆尧教授提供水稻种子,在此一并致谢

* 通讯作者 Author for correspondence. E-mail: jacheng@zju. edu. cn

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 30070500)

Received date: 2004-10-13; Accepted date: 2005-04-10

Biography: BAI Yao-Yu, Ph. D., mainly engaged in insect ecology and bio-safety assessment. E-mail: yybai2001@yahoo. com. cn

separately and concentrations of Cry1Ab within them were determined using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) technique. It was found that, during the jointing and maturing stages, Cry1Ab in the stems and leaf blades of KMD1 ranged $3.74 \sim 7.50$ and $3.78 \sim 9.13 \mu g/g$ fresh weight (FW), respectively, and in those of KMD2 ranged $3.97 \sim 8.29$ and $4.32 \sim 8.84 \mu g/g$ FW, respectively. For each KMD, the Cry1Ab concentration was low in both stems and leaf blades at the jointing as well as booting stage ($3.7 \sim 4.9 \mu g/g$ FW), but it significantly increased at early milking stage, reaching $7.5 \sim 9.1 \mu g/g$ FW. The toxins decreased obviously during maturing stage, while it still reached a level as high as $5.7 \sim 7.8 \mu g/g$ FW.

Three types of paddy soils, marine-fluvigenic yellow loamy paddy soil, pale paddy soil on quaternary red clay and blue clayey paddy soil, which were obviously different in organic matter content, total humic carbon and clay content, were collected from Hangzhou, Jinhua and Jiaxin of China, respectively. In the laboratory, each type of soils received three treatments: (1) supplied with water to give $60\% \sim 80\%$ of water-holding capacity, and then buried with KMD1 stems and leaf blades collected at early milking stage (highly expressing Cry1Ab), (2) submerged in water after being buried with these KMD1 tissues, and (3) sterilized and then mixed with lyophilized powders of KMD2 leaf blades. In each of these treatments, the buried plant tissues or tissue-soil mixtures were sampled at 6-day intervals to determine the Cry1Ab residues using ELISA. During the experiments, all soil-plant tissue systems were maintained in a climatically controlled chamber at 28 ± 1 C and $60\% \sim 80\%$ RH with darkness.

The results revealed that, in each type of soils, the degradation of Cry1Ab in KMD1 stems and leaf blades was more rapid during the early stage, ca. 12d after treatment. Thereafter, however, the degradation slowed, and at 42d after treatment only $0.20 \sim 0.85\mu g/g$ and $0.35 \sim 1.81\mu g/g$ Cry1Ab were retained per g of dry resides of stems and leaf blades, respectively. Cry1Ab degradation rate was found to be closely related to soil type, being the highest in blue clayey paddy soil, and the lowest in marine-fluvigenic yellow loamy paddy soil. Flooding could accelerate the decomposition of plant tissues and thus enhance the degradation of Cry1Ab. Cry1Ab in KMD2 leaf-blade powders degraded more rapidly in non-sterile soils than in sterile soils, suggesting that existence of microbes in soils had great positive effects on the Cry1Ab degradation. The pattern of Cry1Ab degradation in each of these experiments could be described by exponential equations, with the half-life period of degradation being 2. $2\sim11$. 6d. The possible mechanisms of soil type and flooding affecting Cry1Ab degradation were discussed, with soil microbes being the primary factor responsible for degradation.

Key words: Bt rice; Cry1Ab insecticidal proteins; expression; rice paddy soils; degradation

Bt 作物大规模商品化种植的潜在生态风险是国内外学者关注的焦点^[1~3]。土壤是生态系统中物质循环和能量转化的重要场所。在大田种植过程中,Bt 作物植株残体、根系分泌物和花粉等不断向土壤中释放 Bt 杀虫蛋白^[4];Bt 杀虫蛋白易被土壤中的活性颗粒表面吸附而形成结合态,这种结合态能在土壤中持留较长时间且仍然有较强的杀虫活性,并能抵抗土壤微生物的降解^[5~10]。因此,Bt 作物的长期种植可能会使 Bt 杀虫蛋白在土壤生态系统中富集,从而影响土壤特异生物种群、功能类群以及土壤生物多样性和土壤生态过程^[11,12]。Bt 作物对土壤生态系统的影响,已成为继向近缘物种的基因流、对非靶标生物的影响、靶标害虫的抗性等问题之后的又一个热点问题^[13~16]。

Bt 作物释放的 Bt 杀虫蛋白,尤其是秸秆分解释放的 Bt 杀虫蛋白在土壤中能否快速降解,是评价其环境风险大小的核心问题^[17]。迄今,有关土壤中 Bt 杀虫蛋白持留和降解的研究,多以纯化的 Bt 杀虫蛋白或 Bt 棉花、Bt 玉米等作物为试验材料,并

| 在早田主壤中进行""。这些研究表明, Bt 作物样似的 Bt 采虫蛋白在主壤中的解解与 Bt 外源基因、作物品种、主壤性质和环 |
|--|
| 境条件等多种因素有关。一般假设其降解符合一级化学动力学方程[18,21],但也有人提出了降解的经验模型[20]。 |
| 迄今,世界范围内已成功培育出了多个 Bt 水稻品种(系),其中,浙江大学与加拿大渥太华大学合作,在国际上率先用农杆 |
| 菌介导法成功培育的转 Bt cry1Ab 基因水稻品种,对靶标害虫的控制效果明显,已于 1998 年通过我国农业部的批准进行环境 |
| 释放试验 ^[22~24] 。作者以该 Bt 水稻为材料,采用美国 EPA 指定的标准 ELISA 定量试剂盒,研究了其植株茎叶中 Bt 蛋白表达的 |
| 时间动态,以及该 Bt 稻茎叶中 Bt 蛋白在水稻土中的降解动态,以期认识转 Bt 基因水稻植株残体中 Bt 杀虫蛋白在稻田土壤中 |
| 的残留风险及其与环境因子的关系。 |

- 1 材料和方法
- 1.1 供试水稻品种

供试 Bt 水稻品种为浙江大学培育的"克螟稻"(简称 KMD)系列品种,即克螟稻 1 号(KMD1)和克螟稻 2 号(KMD2),均已 得到我国农业部批准进行环境释放。两者以晚粳品种秀水 11(XS11)为亲本,通过农杆菌介导法获得,为转 Bt 基因粳稻纯合品 系;均含 Ubi 启动子基因和 cry1Ab 基因,后代能稳定表达 Cry1Ab 杀虫蛋白,且表达量较高,在室内和田间条件下高抗二化螟、 三化螟和稻纵卷叶螟等 8 种鳞翅目害虫^[24]。KMD1、KMD2 和 XS11 种子经催芽后播种、生长至 30 日龄时(6 月中旬)移栽于浙 江大学华家池校区网室内。

1.2 供试水稻土

分别从浙江省 3 个地点即杭州、金华和嘉兴的水稻田 0~15cm 耕作层采集土壤,于室内参考中国土壤分类系统^[25,26]鉴定 其种类,确认 3 地所采水稻土分别为黄松田(普通简育水耕人为土)、黄筋泥田(普通铁聚水耕人为土)和青紫泥田(底潜铁渗水 耕人为土)。所采土壤经除杂后,避光置于室温下供试。取其中一小部分土壤,经风干、除杂、研碎、混匀并过 2mm 尼龙筛后,用 于测定土壤的理化性质,包括有机质含量、pH 值、氮磷钾含量、阳离子交换量(CEC)、机械组成和腐殖质组分等^[27,28],结果 见表 1。

1.3 Bt 水稻茎叶中 Cry1Ab 杀虫蛋白表达的时间动态

分别在 KMD1、KMD2 及其亲本对照 XS11 的拔节期(移 栽 65d 后)、孕穗期(移栽 80d 后)、灌浆初期(抽穗后1周)和黄 熟期(移栽120d后),在各种植小区内随机取5个分蘖,各品系 3小区内共取15个分蘖。各分蘖于室内作如下处理:剪下叶片 (不包括叶鞘)和茎秆这两个部分,并分别剪成短条,然后加液 氦迅速粉碎、过 2mm 筛,放入一80℃冰箱中。该处理中,设1 个分蘖为1个重复,各品系分别获得15个叶片组织样品和15 个茎组织样品。测定各样品中 Cry1Ab 蛋白含量,每个样品重 复测定 3 次。结果换算为每克鲜重(Fresh weight,简称 FW)组 织中的 Cry1Ab 蛋白含量,用 μg/g 表示。 Bt 水稻茎叶 Cry1Ab 蛋白在不同水稻土中的降解动态。 1.4 1.4.1 淹水对 Cry1Ab 蛋白降解的影响 在 KMD1 及对照 XS11 水稻灌浆初期(抽穗后1周)大量收集鲜嫩、无损伤的茎 秆和叶片。由于 Bt 水稻植株不同部位 Bt 蛋白的表达有差异, 为尽量减少实验误差,取样部位相对固定:茎为水稻由上(穗 部)往下数第2节,叶片为由上(旗叶)往下数第3张(不包括叶 ·鞘)。取适量所收集的组织材料,剪成短条后加液氮粉碎,然后 取适量粉碎后组织用于 Cry1Ab 蛋白含量测定。将所测得的 KMD1 茎和叶片中 Cry1Ab 蛋白含量换算成每克干重(Dry weight,简称 DW)组织中含量,分别为 29.26µg/g 和 16.37µg/ g。Cry1Ab 蛋白降解动态实验设土壤设淹水和非淹水两种处理。

.

表 1 3 种供试水稻土的理化性质

Table 1 Physical and chemical properties of the three paddy soils

used in the experiments

| | 黄筋泥田 | |
|--------------|--|---|
| Marine- | Pale paddy | 青紫泥田 |
| fluvigenic | soil on | Blue clayey |
| yellow loamy | quaternary | paddy soil |
| paddy soil | red clay | |
| | 黄松田 Marine- fluvigenic yellow loamy paddy soil | 黄松田黄筋泥田Marine-Pale paddyfluvigenicsoil onyellow loamyquaternarypaddy soilred clay |

| 有机质 Organic matter content (%) | 2.00 | 2.80 | 4.80 |
|-------------------------------------|-------|------|-------|
| 窗殖质全碳 Humic total carbon (%) | 0.26 | 0.49 | 0.68 |
| 胡敏酸/富里酸 Humic acid / Fulvic acid | 0.53 | 0.36 | 0.51 |
| 全氛 Total N (%) | 0.12 | 0.16 | 0.22 |
| 全磷 Total P (%) | 0.10 | 0.08 | 0.06 |
| 全钾 Total K (%) | 2.22 | 1.44 | 2.29 |
| CEC (Cmol/kg) | 10.00 | 9.50 | 18.40 |
| pH值 pH value | 7.49 | 5.51 | 5.84 |
| 砂砾 Sand content (%) | 26 | 14 | 20 |
| 粗粉粒 Thick silt content (%) | 62 | 26 | 4 |
| 中细粉粒 Thin silt content (%) | 8 | 38 | 50 |
| 粘粒 Clay content(%) | 4 | 22 | 26 |

淹水处理的方法是,将所收集的 KMD1 和 XS11 叶片剪成约 8cm 长的小段,然后将其随机埋入分别盛有上述 3 种水稻土 (厚度约 15cm)的塑料盆(44cm×32cm×20cm)中;埋入位置距土表 3~5cm,每只盆中共埋叶片 40 个,叶片间不相互重叠。然后 向盆内加水,完全淹没土壤,并在土表保留约 2cm 的水层。叶片非淹水处理的方法基本同淹水处理,只是将底部有孔的塑料盆 放置在盛有 2cm 水层的大盆中,将土壤含水量保持在田间最大持水量的 60%~80%。KMD1 和 XS11 叶片的淹水和非淹水处 理分别设置 2~3 只盆。以相同方法处理稻茎。处理后,塑料盆置于 28℃±1℃、60%~80% RH 的人工气候室内,各盆均加盖以

| 阻隔光照,但允许气体交换。其后,每6d取样所埋入的水稻组织1次,共取样7次。取样时,从各盆3个以上点轻轻取出水稻组 |
|--|
| 织,用水小心洗掉其上泥土,用吸水纸吸去组织表面的水,然后迅速剪成小段置于研钵中,加液氮研磨成细小粉末,立即置于一 |
| 80℃冰箱中冷藏备测其中 Cry1Ab 蛋白。Cry1Ab 蛋白测定结果换算为每克干重(DW)组织中的含量,用 μg/g 表示。 |
| 1.4.2 土壤微生物对 Cry1Ab 蛋白降解的影响 收集 KMD2 分蘖盛期水稻叶片,拿回室内取部分先用 75%酒精消毒 1min,然 |
| 后加液氮充分研磨,过 2mm 筛,制成无菌叶冻干粉,放入一80℃冰箱供试。测得该冻干粉中 Cry1Ab 含量为 4.86µg/g FW。 |
| 分别将 3 种水稻土装入直径 1.5cm、长 12cm 的试管中,每管盛土 2.5g,用 7 射线进行照射后获得无菌水稻土。每管加入 |
| KMD2 无菌叶冻干粉 0.5g,与土充分混匀后加适量无菌蒸馏水,使 3 种水稻土的含水量达到田间最大持水量的 50%(2.5g 青 |
| 紫泥田、黄筋泥田和黄松田需分别加水 0.78g、0.73g 和 0.50g,其含水量分别达到 31.3%、29.2%和 19.9%)。设有菌水稻土对 |
| 照处理。经此处理后,每只试管中含 Cry1Ab 蛋白 2.43μg/g FW,算得每克青紫泥田、老黄筋泥田和黄松田土中分别含 Cry1Ab |
| 0.643µg、0.651µg 和 0.694µg。 |

将各处理试管置于 RXZ 型智能人工气候箱(宁波江南仪器厂生产)中,气候箱内保持 25±0.5℃、85%~90% RH,无光照。 其次,每周取样 1 次不同土壤处理试管,测定其内 Cry1Ab 蛋白残留量;共取样 5 次,每次取各土壤处理试管 3 支。

1.5 Bt 杀虫蛋白的测定——ELISA 定量分析

Envirologix Cry1Ab/Cry1Ac 平板试剂盒购自美国 Envirologix 公司,其中包括一块包埋好抗体的 96 孔(12×8)平板及配 套试剂,4 个 Cry1Ab 标样,其浓度分别为 0、0.5、2.5ng 和 5.0 ng。

分别称取 KMD1、KMD2 和 XS11 组织 0.1g 或含有该组织的土样 0.5g,放入 1.5mL 离心管中,加适量抽提液,置于震荡器 上剧烈震荡数秒,进行抽提和离心,取上清液进行稀释。稀释倍数根据事先估算所测样品中的 Cry1Ab 量来确定,保证 Cry1Ab 浓度在标样的范围内。对各样品测 3~5 个重复。

严格按试剂盒说明书上的步骤在规定的时间内加样和测定。所有结果均由酶标仪读取,设置波长为 450nm。每次试验均用 Cry1Ab 标样制作标准曲线,将所得结果换算成供试样品中每克含有的 Cry1Ab 杀虫蛋白含量(ng 或 μg)。

1.6 Bt 水稻茎叶 Cry1Ab 杀虫蛋白在水稻土中的降解模型

选用一级化学反应动力学方程(First-order reaction kinetics)来反映 Bt 水稻茎叶 Cry1Ab 蛋白在水稻土中的降解动态。该 方程能较好拟合 Bt 水稻茎叶在水稻土中经历一定时间后的 Cry1Ab 蛋白残留量^[4]:

$$Y = C_0 e^{-kt} \tag{1}$$

式中,Y为t时间 Cry1Ab 蛋白的残留量(μ g 或 ng);C₀为 Cry1Ab 的初始含量(μ g 或 ng);t为降解时间(d);k为降解速率常数; e 为自然对数。其降解半消减期 $t_{0.5}$ 为:

$$t_{0.5} = 0.693k^{-1} \tag{2}$$

利用(1)式的非线性回归方程和(2)式分别计算降解反应的速率常数 k 和半消减期 $t_{0.5}$ 。

1.7 数据统计分析

Cry1Ab 杀虫蛋白在土壤中残留量的方差分析结果以及降解方程的拟合均使用《实用统计分析及其计算机处理平台》软件^[29]运算所得。

2 结果与分析

2.1 Bt 水稻茎叶中 Cry1Ab 蛋白表达的时间动态 结果表明,在所测定的各个生育期,KMD1、KMD2 叶片和茎中的 Cry1Ab 表达量均比较高,每克鲜组织中达到了 3.7~9.1μg。但相对而言,无论在叶片和茎中,这两种 Bt 稻灌浆初期和黄熟期的 Cry1Ab 表达量均显著高于拔节期和孕穗期(p<0.01),稻灌浆初期表达量又显著高于黄熟期(p<0.05)。叶片和茎中的 Cry1Ab 表达时间格局相似,两者表达量在拔节期和孕穗期十分接近,但在灌浆初期和黄熟期表达量以叶片中的为显著较高 (图 1)。

2.2 Bt 水稻茎叶 Cry1Ab 蛋白在不同水稻土中的降解动态 2.2.1 水稻土类型和淹水处理对 Cry1Ab 蛋白降解的影响 KMD1 稻茎和叶片中 Cry1Ab 蛋白在 3 种土壤淹水和非淹水条 件下的降解动态见图 2 和图 3。总体上看,不论是淹水条件还是 非淹水条件,稻茎和叶片中的 Cry1Ab 蛋白降解均以前期(处理 后前 12d)较快,而中后期显著较慢;处理 42d 后,这两种组织中 的 Cry1Ab 残留量均稳定在 μg 级水平,分别仅有 0.20~ 0.85μg/g DW 和 0.35~1.81μg/g DW。

The second state of the se



图 1 转 Bt cry1Ab 基因水稻 KMD1 和 KMD2 不同生育期茎和叶片

| | 中 Cry1Ab 杀虫蛋白的表达量(均值土标准误,µg/g 组织鲜重). JS: |
|---|---|
| 较慢,其量经 6、12 和 18d 仅分别下降 30.7%、40.8% 和 63.4%; | 出 古 期, BS, 及 蒲 期, FMS, 湛 泡 初 期, MS, 苦 乾 期 |
| 黄筋泥田中降解稍快,经6和12d后分别下降了37.2%和 | |
| | Fig. 1 Concentrations of Cry1Ab insecticidal proteins (mean \pm SE, |
| 65.3%; 育 | μ g per g fresh plant tissue) expressed in the stem and leaf blade of |
| 件下,经 6d 后 Cry1Ab 蛋白在黄松田、黄筋泥田和青紫泥田中的 | transgenic Bt rice KMD1 and KMD2 during different growth stages. |
| 母贸量分别下路了15 3% 76 3%和70 0% 甘下降幅度均不同 | |
| 72. 田 単 刀 刀 下陣 」 43・3 /0、7 0・3 /0 冊 7 3・3 /0 7天 下陣 咽 皮 均 /1 円 | JS: Jointing stage; BS: Booting stage; EMS: Early milking stage; |
| 程度地大于非淹水条件下。在大多数取样时间内,黄松田中 | MS: Maturing stage |
| Cry1Ab 残留量显著高于黄筋泥田和青紫泥田中(p<0.05)。 | 稻茎中 Cry1Ab 残留量与处理后天数呈极显著指数相关(p< |
| 0.01), 拟合方程见图 2。算得 Cry1Ab 在黄松田、黄筋泥田和青紫 | 彩田中的半消减期 t _{0.5} ,淹水条件下分别为 11.2、3.4d 和 2.9d, |
| 非淹水条件下分别为 11.6、8.6d 和 6.9d。 | |
| | |

KMD1 叶片中 Cry1Ab 的降解动态见图 3。非淹水条件卜, 经 6d 和 12d 后寅松田中 Cry1Ab 量分别卜降 「 43.6% 和



图 2 转 Bt cry1Ab 基因水稻 KMD1 稻茎 Cry1Ab 杀虫蛋白在黄松田(A)、黄筋泥田(B)和青紫泥田(C)淹水与非淹水条件下的降解动态 Fig. 2 Degradation dynamics of Cry1Ab insecticidal proteins of stems of transgenic Bt rice KMD1 in the marine-fluvigenic yellow loamy paddy soil (A), pale paddy soil on quaternary red soil (B) and blue clayey paddy soil (C) under flooded and unflooded conditions. 图中值指每克干茎中的 Cry1Ab 含量; * * 表示在 0.01 水平上差异显著,下同 The values of Cry1Ab residue were those in per g dry stems; * * denote significant difference at 0.01 levels, the same as the following figures

57.1%,黄筋泥田中分别下降了 45.2%和 66.7%;青紫泥田中降解明显较快,经 6d 后即下降了 60.7%。淹水条件下,经 6d 后黄 松田中 Cry1Ab 量下降了 42.7%,其降解速度接近非淹水条件下;但在黄筋泥田和青紫泥田中,淹水条件下其降解速度明显快

于非淹水条件下,经 6d 后 Cry1Ab 量分别下降了 67.6%和 75.9%。在大多数取样时间内,黄松田中 Cry1Ab 残留量显著高于黄筋泥田和青紫泥田(p<0.05)。稻叶中 Cry1Ab 残留量与降解时间呈极显著指数相关(p<0.01),拟合方程见图 3。算得 Cry1Ab 在黄松田、黄筋泥田和青紫泥田中的半消减期 to.5,淹水条件下分别为 8.1、3.7d 和 3.0d,非淹水条件下分别为 9.4、7.9 和 5.4d。



图 3 转 Bt cry1Ab 基因水稻 KMD1 叶片 Cry1Ab 蛋白在黄松田(A)、黄筋泥田(B)和青紫泥田(C)淹水与非淹水条下的降解动态 Fig. 3 Degradation dynamics of Cry1Ab insecticidal proteins in leaf blades of transgenic Bt rice KMD1 in the marine-fluvigenic yellow loamy paddy soil (A), pale paddy soil on quaternary red soil (B) and blue clayey paddy soil (C) under flooded and unflooded conditions 图中值指每克干叶片中的 Cry1Ab 含量 The values of Cry1Ab residue were those in per g dry leaf blades

上述结果表明,KMD1 稻茎和叶片中 Cry1Ab 蛋白在水稻土中的降解动态与土壤类型密切相关,青紫泥田中降解较快,而 黄松田中则明显较慢。淹水可显著促进这两种稻株组织中 Cry1Ab 蛋白的降解,但其促进程度因土壤类型而异。 2.2.2 土壤微生物对 Cry1Ab 蛋白降解的影响 结果表明,对同种土壤,KMD2 稻粉碎叶中 Cry1Ab 蛋白在有菌土中的降解 快于无菌土中;在同样无菌条件下,青紫泥田中 Cry1Ab 降解速度明显快于黄筋泥田和黄松田中(图 4)。有菌与无菌条件下的降 解动态均可用一级化学动力学指数方程准确拟合,Cry1Ab 残留量和降解时间呈极显著指数相关(*p*<0.01)。无菌条件下, Cry1Ab 在青紫泥田、黄筋泥田和黄松田中的半消减期 *t*_{0.5}分别为 2.6、3.8d 和 4.1d,有菌条件下 *t*_{0.5}出现不同程度缩短,分别为 2.2、2.4d 和 2.4d,表明土壤微生物存在可加快 Cry1Ab 蛋白的降解。

3 结论与讨论

Bt 杀虫蛋白在土壤中的环境动态的研究主要有 ELISA 定量和昆虫生测两种方法,二者的结果有时存在不一致性^[17]。昆虫 生测法由于可受众多不可知因素的干扰,其准确性和可靠性往往受到影响,如通过生测法所反应的 Bt 作物 Bt 蛋白杀虫性通常 是植物内部次生代谢物等各种因子与 Bt 蛋白互作的结果^[30,31]。相比之下,ELISA 定量方法能否对 Cry1Ab 进行准确定量,关键 在于土壤中与粘粒紧密结合的 Bt 蛋白能否被土壤提取/稀释缓冲液完全提取,而据报道,ELISA 法对 Bt 作物秸秆 Bt 蛋白在土 壤中的提取率可达到 60%~80%^[32]。因此,在定量研究 Bt 作物 Bt 蛋白在不同土壤中的环境动态,估算其消减半衰期时应用 ELISA 定量方法较好,在估算 EC₅₀(半数有效浓度)时应用昆虫生测法较好。但在评价 Bt 作物外源基因表达产物在土壤中的安 全性时,往往将 ELISA 定量测定与昆虫生测法结合进行^[33]。



图 4 转 Bt cry1Ab 基因水稻 KMD2 叶片粉 Cry1Ab 蛋白在黄松田(A)、黄筋泥田(B)和青紫泥田(C)有菌与无菌条件下的降解动态 Fig. 4 Degradation dynamics of Cry1Ab insecticidal proteins in leaf blade powder of transgenic Bt rice KMD2 in the marine-fluvigenic yellow loamy paddy soil (A), pale paddy soil on quaternary red soil (B) and blue clayey paddy soil (C) under nonsterile and sterile conditions

图中值指每克叶片粉-土壤混合物中的 Cry1Ab 含量 The values of Cry1Ab residue were expressed in per g fresh mixture of leaf blade powder and soils

1588

土壤类型与供试材料中的 Cry1Ab 蛋白降解存在着某种密切关系。本实验中 3 种供试土壤以青紫泥田中的降解最快,这可能主要和土壤的理化特性有关。土壤有机质可改善土壤结构、持水量和通气性,是细菌等土壤微生物的重要营养来源。对不同类型的土壤,由于其有机质含量不同,其中的微生物数量及其生物活性往往不同^[34]。在本研究中,青紫泥田中的有机质含量较高(表1),这在一定程度上决定了其土壤微生物数量较大、活性较强。这种基于有机质的土壤微生物数量和活性差异,与汪海珍等^[35]的报道一致,他们发现青紫泥田土壤微生物生物量碳为 928.9mg/kg,明显高于黄筋泥田 417.8mg/kg 和黄松田 302.2 mg/kg。土壤中有机质和腐殖质等活性颗粒具有高度特殊的表面积和离子交换能力,对 Bt 蛋白有吸附作用^[4]。许多研究表明, 微生物活性高的土壤,虽然对其中的一些化学残留物(如农药等)的降解较快,但形成的抗微生物降解的结合态残留物也较多^[35]。在本试验有机质含量高的青紫泥田中,试验中后期 Cry1Ab 蛋白的残留量并没有显著低于其它两种土壤中,说明此时虽然青紫泥田中微生物活性高,但腐烂 Bt 稻组织茎叶向土壤中释放的 Cry1Ab 蛋白量极有可能被大量吸附在了土壤活性颗粒表面,从而抗微生物的降解。

土壤微生物对 Cry1Ab 蛋白的降解影响显著,无菌土中 Cry1Ab 蛋白的半消减期明显长于有菌土中的,这和 Palm 等^[36]用 γ 射线处理土壤后的试验结果相似,说明土壤微生物是影响土壤中 Bt 杀虫蛋白降解的主要因子之一^[7]。据此可推测,在本研究 中,Bt 稻粉碎叶中 Cry1Ab 蛋白在试验的前 6d 大量释放,造成其快速降解的主要原因是 Cry1Ab 蛋白在自由态下被土壤微生 物作为一种碳源或氮源分解利用所致^[36]。

淹水可显著促进土壤中 Bt 稻 Cry1Ab 蛋白的降解。究其机制,一种可能的途径是,淹水改变了土壤微生物的种类、数量或 活性,从而促进其对 Cry1Ab 蛋白的分解利用;另一种途径是,淹水后,由于某些种类微生物的数量或活性得到增强等原因,水 稻组织的腐解明显加快^[37](在本研究中,淹水后水稻组织腐解加快的现象相当明显),由此有利于 Cry1Ab 蛋白的释放,从而可 促进其降解。

总之,结果表明,转 Cry1Ab 基因水稻茎和叶片中 Cry1Ab 的表达量均以拔节期和孕穗期相对较低,灌浆初期显著升高,黄熟期虽又明显下降但仍然维持在较高的表达量。KMD1 茎和叶片中 Cry1Ab 在 3 种水稻土中的降解均以前期(处理后 12d 内)

较快,中后期明显放慢。Cry1Ab降解动态与土壤类型密切相关,青紫泥田中降解最快,黄筋泥田中次之,黄松田中最慢。淹水可加快土壤中茎和叶的腐解,从而促进其中Cry1Ab的降解。Cry1Ab在有菌水稻土中的降解快于无菌土中,表明土壤微生物存在可加快Cry1Ab蛋白的降解,其降解过程可用指数方程进行拟合。这些研究结果无疑为Bt水稻环境安全性评价提供了基础理论依据。由于室内可控条件和室外大田环境有很大的不同,今后有待于在大田环境条件下研究此类作物外源Bt杀虫蛋白的环境动态,对其在土壤中的降解规律进行系统的长期定位监测与研究。

References:

[1] Wolfenbarger L L, Phifer P R. The ecological risks and benefits of genetically engineered plants. Sci., 2000, 290: 2088~2093.
[2] Qian Y Q, Wei W, Sang W G, et al. Effect of transgenic crops on biodiversity. Acta Ecol. Sin., 2001, 21(3): 337~343.
[3] Zhang Y J, Wu K M, Peng Y F, et al. The ecological risks of genetically engineered plants. Acta Ecol. Sin., 2001, 22(11): 1951~1959.

- [4] Bai Y Y, Jiang M X, Cheng J A, et al. Advances in safety studies of soil Bt toxin proteins released from transgenic Bt crops. Chin. J.
 Appl. Ecol., 2003, 14(11): 2062~2066.
- [5] Tapp H, Calamai L, Stotzky G. Adsorption and binding of the insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* and subsp. *tenebrionis* on clay minerals. *Soil Biol. Biochem.*, 1994, 26: 663~679.
- [6] Tapp H, Stotzky G. Insecteidal activity of the toxin from Bacillus thuringiensis subsp. kurstaki and tenebrionis adsorbed and bound on pure and soil clays. Appl. Environ. Microbiol., 1995, 61(5): 1786~1790.
- [7] Tapp H, Stotzky G. Persistence of the insecticidal toxin from Bacillus thuringienis subsp. kurstaki in soil. Soil Biol. Biochem., 1998, 30
 (4): 471~476.
- [8] Crecchio C, Stotzky G. Insecticidal activity and biodegradation of the toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* bound to humic acids from soil. *Soil Biol. Biochem.*, 1998, **30**(4): 463~470.
- [9] Crecchio C, Stotzky G. Biodegradation and insecticidal activity of the toxin from Bacillus thuringiensis subsp. kurstaki bound on complexes of montmorillonitc-humic acids -Al hydroxypolymers. Soil Biol. Biochem., 2001, 33: 573~581.
- [10] Stotzky G. Persistence and biological activity in soil of insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis* and of bacterial DNA bound on clays and humic acids. J. Environ. Qual., 2000, 29: 691.
- [11] Morra M J. Assessing the impact of transgenic plant products on soil organisms. Mol. Ecol., 1994, 3: 53~55.
- [12] Jack B. Assessing the environment impact of transgenic plants. Trends Biotech., 2001, 19(9): 371~372.
- [13] Wang Z H, Ye Q F, Shu Q Y, et al. The transfer of foreign genes and its expression products in genetically modified crops. Acta Ecol. Sin., 2002, 22(9): 1521~1526.
- [14] Wang H X, Chen X, Tang J J, et al. Influence of the the straw decomposition of Bt transgenic rice on soil culturable microbial flora. Acta Ecol. Sin., 2004, 24(1): 89~94.
- [15] Wang J W, Fen Y J, Luo S M. Effects of transgenic crops on soil ecosystem. Chin. J. Appl. Ecol., 2002, 13(4): 491~494.
- [16] Wang J W, Luo S M, Fen Y J, et al. Environmental fate and ecological effects of Bt toxin from transgenic Bt crops in soil. Acta Ecol. Sin., 2003a, 23(4): 797~804.
- [17] Wang J W, Fen Y J, Luo S M. Studies on spatial-temporal dynamics of insecticidal protein expression of Bt corn and its degradation in soil. Sci. Agric. Sin., 2003b, 36(11): 1279~1286.
- [18] Sims S R, Holden L R. Insect bioassay for determining soil degradation of *Bacillus thuringiensis* subsp. kurstaki Cry1A(b) protein in corn tissue. Environ. Entomol., 1996, 25(3): 659~664.
- [19] Saxena D, Stotzky G. Insecticidal toxin from *Bacillus thuringiensis* is released from roots of transgenic Bt corn in Vitro and in Situ. FEMS Microb. Ecol., 2000, 33: 35~39.
- [20] Herman R A, Scherer P N, Wolt J D. Rapid degradation of Binary, PS149B1,δ-endotoxin of *Bacillus thuringiensis* in soil, and a novel mathematical model for fitting curve-linear decay. *Physiol. Chem. Ecol.*, 2002, **31**(2): 208~214.
- [21] Sims S R, Ream J E. Soil inactivation of the Bacillus thuringiensis subsp. kurstaki Cry2A insecticidal protein within transgenic cotton tissue: laboratory microcosm and field studies. J. Agric. Food Chem., 1997, 45: 1502~1505.
- [22] Shu Q Y, Ye G Y, Cui H R, et al. Development of transgenic Bacillus thuriengiensis rice resistant to rice stem borers and leaf folders. J. Zhejiang Agric. Univ., 1998, 24(6): 579~580.
- [23] Wu G, Cui H R, Shu Q Y, et al. Inheritance stability and expression of cry1Ab gene in progenies of transgenic "Kemingdao". J. Agric. Biotech., 2000, 8(3): 253~256.
- [24] Shu Q Y, Ye Q Y, Cui H R, et al. Transgenic rice plants with a synthetic cry1Ab gene from Bacillus thuringiensis were highly resistant

to eight lepidopteran rice pest species. Mol. Breed, 2000, 6: 433~439.

- [25] Yu Z Y. Soils of Zhejiang. Hangzhou: Zhejiang Scientific and Technical Publishesrs, 1994.
- [26] Institute of Soil Science, Academia Sinica, Nanjing. Keys to Chinese Soil Taxonomy (3rd edition). Hefei: University of Science and Technology of China Press, 2001.
- [27] Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing. Determinination of Soil Physical Properties. Beijing: Science Press, 1978.
- [28] Nanjing Agricultural University. Agricultural Chemical Analysis of Soil. Beijing: China Agriculture Press, 1992.
- [29] Tang Q Y, Feng M G. DPs Data Processing System for Practical Statistics. Beijing: Science Press, 2002.
- [30] Navon A, Hare J D, Federici B A. Interaction among Heliothis virescens larvae, cotton condensed tannin and the Cry1A(c) deltaendotoxin of Bacillus thuringiensis. J. Chem. Ecol., 1993, 19: 2485~2499.

[31] Zhang Y J, Yang J, Guo Y Y, et al. Study on the interactions beween exogenous Bt-ICP and cotton terpenoids chemicals. Sci. Agric.

Sin., 2002, 35(5): 514~519.

- Palm C J, Donegan K, Harris D, et al. Quantification in soil of Bacillus thuringiensis var. kurstaki &-endotoxin from transgenic plants. [32] *Mol. Ecol.*, 1994, **3**: 145~151.
- Saxena D, Flores S, Stotzky G. Insecticidal toxin in root exudates from Bt corn. Nature, 1999, 402: 480. [33]
- Steven R S, Larry R H. Insect bioassay for determining soil degradation of Bacillus thuringiensis subsp. kurstaki Cry1A(b) protein in $\lfloor 34 \rfloor$ corn tissue. Physiol. Chem. Ecol., 1996, 25(3): 659~664.
- Wang HZ, Xu JM, Xie ZM, et al. Degradation of metsulfuron-methyl in soils I. effect of soil properties. Chin. J. Appl. Ecol., 35 2003, 14(1): 79~84.
- Palm C J, Schaller D L, Donegan K K, et al. Persistence in soil of transgenic plants produced Bacillus thuringiensis var. kurstari 8-36 endotoxin. Can. J. Microbiol., 1996, 42: 1258~1262.
- Chen HG, Fan QS. Microbiology. Beijing: China Agriculture Press, 1979. [37]

参考文献:

- 钱迎倩,魏伟,桑卫国,等.转基因作物对生物多样性的影响.生态学报,2001,21(3):337~343. $\begin{bmatrix} 2 \end{bmatrix}$
- 张永军,吴孔明,彭于发,等.转基因植物的生态风险.生态学报,2001,22(11):1951~1959. [3]
- 白耀宇,蒋明星,程家安,等.转 Bt 基因作物 Bt 毒蛋白在土壤中的安全性研究.应用生态学报,2003,14(11):2062~2066. $\begin{bmatrix} 4 \end{bmatrix}$

- [13] 王忠华,叶庆富,舒庆尧,等.转基因植物中外源基因及其表达产物转移的途径.生态学报,2002,22(9):1521~1526.
- 王洪兴, 陈欣, 唐建军, 等. 转 Bt 基因水稻秸秆降解对土壤微生物可培养类群的影响. 生态学报, 2004, 24(1): 89~94. $\begin{bmatrix} 14 \end{bmatrix}$
- 王建武,冯远娇,骆世明.转基因作物对土壤生态系统的影响.应用生态学报,2002,13(4):491~494. [15]
- 王建武, 骆世明, 冯远娇, 等. 转 Bt 基因作物 Bt 毒素在土壤中的环境去向及其生态效应. 生态学报, 2003a, 23(4): 797~804. $\begin{bmatrix} 16 \end{bmatrix}$
- 王建武,冯远娇,骆世明. Bt 玉米抗虫蛋白表达的时空动态及其土壤降解研究. 中国农业科学,2003b,36(11):1279~1286. $\begin{bmatrix} 17 \end{bmatrix}$
- 舒庆尧, 叶恭银, 崔海瑞, 等. 转基因水稻"克螟稻"选育. 浙江农业大学学报, 1998, 24(6): 579~580. $\begin{bmatrix} 22 \end{bmatrix}$
- 吴刚,崔海瑞,舒庆尧,等. cry1Ab 基因在转基因"克螟稻"后代中的遗传稳定性及表达. 农业生物技术学报,2000,8(3):253~256. [23]
- 俞震豫,中国土壤分类系统,见:浙江土壤,杭州:浙江科学技术出版社,1994. [25]
- 中国科学院南京土壤科学研究所.中国土壤系统分类检索(第3版).合肥:中国科学技术大学出版社,2001. $\begin{bmatrix} 26 \end{bmatrix}$
- 中国科学院南京土壤科学研究所.土壤物理性状分析.北京:科学出版社,1978. [27]
- 南京农业大学.土壤农化分析.北京.农业出版社,1992. $\begin{bmatrix} 28 \end{bmatrix}$
- 唐启义,冯明光.实用统计分析及其计算机处理平台.北京:科学出版社,2002. [29]
- 张永军,杨舰,郭予元,等. 外源 Bt 杀虫蛋白和棉花主要抗虫萜烯类物质互作关系研究. 中国农业科学, 2002, 35(5): 514~519. [31]
- 汪海珍,徐建民,谢正苗,等. 土壤环境中除草剂甲磺隆降解的研究 I. 土壤性质的影响. 应用生态学报,2003,14(1):79~84. [35]

陈华癸,樊庆笙. 微生物学. 北京: 中国农业出版社, 1979. [37]



.

•

.