

DOI: 10.5846/stxb201605301036

雒珺瑜, 崔金杰, 张帅, 朱香镇, 吕丽敏, 王春义, 张利娟, 王丽, 李春花, 周治国. 盐碱土壤转 Bt 基因棉花外源蛋白表达量时空变化及对抗虫性的影响. 生态学报, 2017, 37(16): 5474-5481.

Luo J Y, Cui J J, Zhang S, Zhu X Z, Lu L M, Wang C Y, Zhang L J, Wang L, Li C H, Zhou Z G. The effects of temporal and spatial variation of exogenous protein of transgenic Bt cotton to insect resistance in saline-alkali soil. Acta Ecologica Sinica, 2017, 37(16): 5474-5481.

盐碱土壤转 Bt 基因棉花外源蛋白表达量时空变化及对抗虫性的影响

雒珺瑜¹, 崔金杰¹, 张 帅¹, 朱香镇¹, 吕丽敏¹, 王春义¹, 张利娟¹, 王 丽¹, 李春花¹, 周治国^{2,*}

¹ 中国农业科学院棉花研究所, 棉花生物学国家重点实验室, 安阳 455000

² 南京农业大学农学院, 农业部南方作物生理生态重点开放实验室, 南京 210095

摘要: 盐碱地是潜在的可利用耕地资源, 但土壤盐碱化严重制约了农业生产的可持续发展。基于棉花机械化程度低、劳动力成本和生产资料投入剧增、比较效益下降和实施粮食生产安全战略等因素影响, 我国长江流域和黄河流域棉花面积锐减, 种植区域向内陆盐碱旱地或滨海盐碱地转移, 但目前针对盐碱地转 Bt 基因棉种植可能带来的生态安全性问题研究甚少, 正成为国内外研究的焦点和热点。伴随着棉花向盐碱地大面积转移种植趋势, 检测盐胁迫是否影响转基因抗虫棉抗虫性, 明确其影响程度, 直接关系到转基因抗虫棉种植的安全性, 也是目前抗虫棉扩大生产中迫切需要解决的问题。以非转基因棉花为对照, 分别在低盐、中盐和高盐土壤种植的棉花的苗期、蕾期和花铃期采样, 室内测定了转 Bt 基因棉花叶片对棉铃虫幼虫校正死亡率和外源蛋白表达量。研究结果发现盐分胁迫下转 Bt 基因棉花苗期叶片对棉铃虫幼虫校正死亡率下降了 9.22%—47.46%, 蕾期下降了 31.61%—45.42%, 花铃期下降了 3.59%—18.52%; 土壤盐分显著降低了转 Bt 基因棉花叶片中外源蛋白的表达量, 苗期功能叶外源蛋白表达量下降了 7.66%—29.86%; 蕾期下降了 3.77%—36.85%; 花铃期下降了 18.13%—41.02%; 相关性分析表明, 盐分胁迫条件下转 Bt 基因棉花叶片中外源蛋白表达量与其对棉铃虫抗性程度存在正相关关系。结果表明, 盐碱土壤显著降低了转 Bt 基因棉花叶片外源杀虫蛋白表达量, 从而导致转 Bt 基因棉花叶片对棉铃虫的抗性下降。研究土壤盐分对转 Bt 基因棉花对棉铃虫的影响及其作用机制, 可为建立盐碱地转 Bt 基因棉花田害虫综合防控技术体系、转 Bt 基因棉花环境安全评价及转 Bt 基因棉安全管理提供依据。

关键词: 土壤盐分; 转 Bt 基因棉花; 外源蛋白表达量; 抗性; 时空变化

The effects of temporal and spatial variation of exogenous protein of transgenic Bt cotton to insect resistance in saline-alkali soil

LUO Junyu¹, CUI Jinjie¹, ZHANG Shuai¹, ZHU Xiangzhen¹, LU Limin¹, WANG Chunyi¹, ZHANG Lijuan¹, WANG Li¹, LI Chunhua¹, ZHOU Zhiguo^{2,*}

¹ Institute of Cotton Research of Chinese Academy of Agricultural Sciences/State Key Laboratory of Cotton Biology, Anyang 455000, China

² College of Agriculture, Nanjing Agricultural University/Key Laboratory of Crop Physiology & Ecology in Southern China, Ministry of Agriculture, Nanjing 210095, China

Abstract: Saline-alkali land is a potentially exploitable reserve cultivated land resource, but it severely restricted the sustainable development of agricultural production. Owing to some factors such as the decreasing degree of cotton

基金项目: 国家自然科学基金 (31501253)

收稿日期: 2016-05-30; 网络出版日期: 2017-03-27

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: giscott@njau.edu.cn

mechanization, increasing input of labor cost and production goods, declining comparative benefits, and implementing the strategy of food security, the cotton area in the Yangtze River and Yellow River is declining sharply, and the planting area is transferred to Binhai saline-alkali lands. Since the study of ecological security of planting Bt cotton in saline-alkali land is rare, it became the focus of many research studies worldwide. Whether the resistance of transgenic Bt cotton to cotton bollworm has been affected remains to be elucidated. Resistance is directly related to the environment safety of transgenic Bt cotton; therefore, there is an urgent need to solve the problems in cotton production. With the non-transgenic cotton as the control, we measured the corrected mortality of transgenic Bt cotton to cotton bollworm larvae and the contents of exogenous protein of transgenic Bt cotton that was planted in the low-, medium- and high-salt soil at seedling, budding, and flowering and bolling stages, respectively. The results showed that at the seedling, budding, and flowering and bolling stages of transgenic Bt cotton in low salt stress, the correction mortality of transgenic Bt cotton planted in the medium- and high-salt soil to cotton bollworm larvae decreased by 9.22%—47.46%, 31.61%—45.42%, and 3.59%—18.52%, respectively. Over the same period of Bt cotton, soil salinity significantly inhibited the expression of Bt protein in cotton leaves and decreased by 7.66%—29.86%, 3.77%—36.85%, and 18.13%—41.02% at seedling, budding, and flowering and bolling stages, respectively. There is a significant positive correlation between the efficiency of insect resistance of transgenic Bt cotton to cotton bollworm larvae and Bt protein content. Therefore, soil salinity levels inhibited the exogenous protein expression of transgenic Bt cotton, which led to the decreased resistance of transgenic Bt cotton on cotton bollworm. The present study on the effects and mechanisms of soil salinity on the influence of transgenic Bt cotton to cotton bollworm can provide a comprehensive basis for establishing Bt cotton pest prevention and control technology system, environmental safety evaluation, and safety management in soil salinity in Bt cotton fields.

Key Words: soil salinity; transgenic Bt cotton; expression of the exogenous protein; insect resistance; temporal and spatial variation

气候条件的日益恶化,土壤盐渍化已成为制约世界农业可持续发展的重要因素^[1-2]。我国是盐碱地面积最大的国家之一,棉花是我国重要的经济作物,也是一种中等耐盐碱作物,为保障我国粮食生产和棉花生产安全,潜在可利用的大面积盐碱地是棉花生产的主要方向^[3]。

盐分对植株地上部形态、生理特征、光合作用、代谢进程等方面的影响的研究已引起很多专家和学者的关注与研究^[4-6]。我国转 Bt 基因棉花的种植面积超过 370 万 hm^2 , 占我国棉花种植面积的 96% 以上^[7], 转 Bt 基因棉花不仅有效对抗棉花棉铃虫, 也因为减少农药的使用也对人类与环境友好^[8], 同时随着转基因抗虫棉的推广普及, 棉田害虫生态地位发生了重大变化, 棉田次要害虫上升为主要害虫^[9-12], 并呈现逐步蔓延和大面积灾变的发展趋势^[13-18]; 同时, 环境条件对转 Bt 基因棉花抗虫效果有重要的影响^[8], 其中温度^[19-21]、干旱、涝渍^[22-24]等逆境条件均能抑制棉花的抗虫性和外源蛋白的表达量, 而施氮量可促进转 Bt 基因棉花外源蛋白的合成, 促使棉花抗虫性增强^[25-26]。盐胁迫转 Bt 基因棉花对棉铃虫控制作用及其外源蛋白表达量变化方面的研究, Iqbal 等^[27]在对印度多种棉花进行了盐胁迫和外源蛋白的检测, 表明胁迫盐分浓度与外源蛋白含量成反比。Jiang 等^[28]在室内采用 NaCl 胁迫棉花结果表明, 盐分胁迫抑制了转 Bt 基因棉花苗期叶片外源蛋白表达量。前人在室内且单一 NaCl 胁迫下在棉花苗期进行了实验, 对棉花生长后期外源蛋白表达量变化规律未见明确报道, 对转 Bt 基因棉花受盐分胁迫响应的认识仍然有限, 且棉田害虫主要发生在棉花生长的中期和后期, 土壤盐分胁迫对棉花整个生长发育时期外源蛋白表达量时空变化直接影响转 Bt 基因棉花对棉铃虫抗性的变化是目前生产上重要的需要解决的问题。

因此, 在粮棉争地矛盾日益突出, 盐渍化和次生盐渍化土壤不断加剧的背景下, 基于转 Bt 基因棉花向盐碱地大面积转移种植趋势, 明确盐碱土壤种植转 Bt 基因棉花其外源蛋白表达量时空变化规律及其与抗虫性的关系, 采取耐盐碱栽培调控措施, 增强棉花自身对外界逆境的抵御能力, 提高棉花产量和品质是确保盐碱地

棉花丰产丰收的迫切需要和关键因素之一。本文以转 Bt 基因棉花为试验材料,以其亲本非转基因棉花为对照,在盐碱地原位土柱中进行了连续 2a 的重复研究试验,从土壤盐分水平动态、转 Bt 基因棉花叶片外源蛋白表达量时空变化入手,研究并阐明盐碱土壤转 Bt 基因棉花外源蛋白表达量时空变化对抗虫性的影响,为棉花生产中增强盐碱地转 Bt 基因棉花对害虫及外界逆境胁迫的抵御能力采取栽培调控技术提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

棉花材料 GK19 为转 *Cry1Ac* 基因棉花,启动子为 35s,终止子为 NOS,由湖北省沙洋监狱管理局农业科学研究所、湖北省种子管理站、中国农业科学院生物技术研究所等单位选育,2002 年通过山西省审定;泗棉 3 号为 GK19 的亲本受体,为非转基因棉花,均由湖北省农业科学院植保土肥所提供。

棉花种植 试验于 2013 年和 2014 年的 6 月至 9 月开展。棉花种植于江苏大丰市稻麦原种场试验农场。选择田间盐分水平差异较大的 3 个地块作为低盐、中盐和高盐胁迫处理,在各盐分土壤原位设置土柱,棉花采用营养钵育苗移栽方法种植,棉花管理按高产栽培要求进行。

1.2 测定内容与方法

1.2.1 土壤盐分测定

在棉花苗期、蕾期和花铃期,用土壤取样器采集棉株根际周围 0—2 cm 范围内距地表 10—20 cm 土层土壤室内自然风干后,研磨去杂过筛,采用“质量”法进行盐分含量测定^[29]。

称取风干土样 100.0 g 放入 1000 mL 广口三角瓶中,加入去 CO_2 水 500 mL 后塞紧瓶口,放入摇床 120 rpm/min 振荡 20 min,3000 rpm/min 离心 5 min 至上清液透明;吸取上清液 100 mL,移入已知重量的 250 mL 三角瓶中,放置在水浴上蒸干后放入烘箱 105℃ 烘干 4 h,取出移入干燥器中冷却约 30 min 在分析天平上称重;再放入烘箱 105℃ 重复烘 2 h,冷却,称至恒重,要求两次重量之差不得大于 0.0003 g。可溶性盐分计算公式如下:

$$\text{可溶性盐含量}(\%) = (m_1 - m_0) / m \times 100$$

式中,可溶性盐总量为土壤可溶性盐总量质量分数(%); m_1 为烧杯与盐分质量之和(g); m_0 为空烧杯质量(g); m 为吸取待测液体积相当样品质量(g);100 为换算成每百克含量。

1.2.2 转 Bt 基因棉抗虫性生物测定

(1) 试虫来源 棉铃虫由中国农业科学院棉花研究所养虫室提供,系 2012 年 9 月采自田间,在室内(温度: $(27 \pm 0.5)^\circ\text{C}$,相对湿度: $(75 \pm 5)\%$,光照周期; L:D=14 h:10 h)连续饲养 10 代,对化学农药及转 Bt 基因棉花或 Bt 制剂没有抗性。

(2) 棉铃虫抗性生物测定 参照农业行业标准《棉花抗棉铃虫性鉴定方法》(NY/T2162—2012)^[30] 和国家标准《转基因植物及其产品环境安全检测抗虫棉花第 1 部分:对靶标害虫的抗虫性》(农业部 1943 号公告-3—2013)^[31],在棉花生长的苗期(二代棉铃虫发生期)分别采集棉花主茎功能叶,蕾期(三代棉铃虫发生期)和花铃期(四代棉铃虫发生期)分别采集棉花上部果枝顶部嫩蕾对位叶进行室内抗虫性生物测定。每小区采集 10 片棉花叶片,每片叶片装进一个生物测定盒(高 10 cm,直径 8 cm),人工接入 1 d 龄棉铃虫幼虫,盖紧盒盖,置于温度为 $(27 \pm 0.5)^\circ\text{C}$,相对湿度 $(75\% \pm 5\%)$,光照周期 L:D=14 h:10 h 条件下饲养 5 d,第 6 天调查生物测定盒内棉铃虫存活数;以非转基因棉花泗棉 3 号叶片的棉铃虫幼虫死亡率为对照,计算转基因抗虫棉 GK19 棉花对棉铃虫幼虫抗性的校正死亡率。计算公式如下:

$$\text{幼虫校正死亡率}(\%) = \frac{\text{处理材料幼虫死亡率} - \text{对照材料幼虫死亡率}}{(1 - \text{对照材料幼虫死亡率})} \times 100$$

式中,处理材料幼虫死亡率为转基因抗虫棉花幼虫死亡率;对照材料幼虫死亡率为非转基因棉花幼虫死亡率;1 为校正常数。

1.2.3 外源 Bt 蛋白检测

取样 在棉花生长的苗期(二代棉铃虫发生期)分别采集棉花主茎功能叶,蕾期(三代棉铃虫发生期)和花铃期(四代棉铃虫发生期)分别采集棉花上部果枝顶部嫩蕾对位叶。每小区采集 5 片叶片, -80℃ 速冻后保存,用于 Bt 蛋白表达量的测定;采样时间和部位与生物测定取样一致。

Bt 蛋白检测 采用 ELISA 方法,称取新鲜棉花叶片 0.4 g,液氮快速研磨,加入 4 mL PBS 提取液,4℃ 摇床(200 r/min)过夜;8000 r/min 离心取上清待测;外源蛋白表达量检测操作均按检测试剂盒说明书严格进行,检测试剂盒为美国 ENVIROLOGIX 公司生产的 Cry1Ac/Cry1Ab(型号 AP003 CRBS)检测试剂盒。

1.3 数据统计与分析方法

利用 Excel 软件对数据进行基本处理和筛选,针对研究区土样和测定分析结果,运用 SPSS 17.0 软件对所有数据进行统计分析,采用单因素方差分析(One-way analysis, ANOVA)和 Duncan's 差异显著性分析($P < 0.05$),检验同一时期不同小区转 Bt 基因棉花室内生物测定及外源 Bt 蛋白含量显著性差异;同时利用该软件采用比较平均值方法进行了相关性分析。

2 结果

2.1 棉田土壤盐分水平动态变化

土壤盐分水平见表 1。棉田土壤盐分水平随棉花生长发育时期和季节变化呈现出动态变化趋势。2013 年土壤盐分水平分别在苗期、蕾期和花铃期表现出逐渐升高的趋势,2014 年在苗期和蕾期表现升高,花铃期下降;盐分处理间差异显著(2014 年苗期除外)。

表 1 土壤盐分水平动态变化规律/%

Table 1 Variation of soil salt levels in different seasons

处理 Treatment	2013			2014		
	苗期 Seedling stage	蕾期 Budding stage	花铃期 Flowering and bolling stage	苗期 Seedling stage	蕾期 Budding stage	花铃期 Flowering and bolling stage
GL	0.13±0.01a	0.23±0.01 a	0.52±0.02 a	0.42±0.05 a	0.62±0.03 a	0.38±0.03 a
GM	0.23±0.02 b	0.28±0.01 ab	0.67±0.02 ab	0.42±0.03 a	0.77±0.03 b	0.47±0.03 b
GH	0.34±0.01 c	0.35±0.02 b	0.74±0.02 b	0.51±0.02 b	0.84±0.05 b	0.64±0.04 c
SL	0.12±0.01 a	0.23±0.01 a	0.55±0.01 a	0.46±0.02 a	0.53±0.03 a	0.31±0.03 a
SM	0.20±0.02 ab	0.32±0.04 b	0.58±0.02 a	0.47±0.03 a	0.81±0.03 b	0.40±0.02 ab
SH	0.26±0.02 b	0.40±0.01 b	0.73±0.03 b	0.50±0.02 a	0.83±0.03 b	0.43±0.03 b

SL:泗棉 3 号低盐处理 Treatment of low soil-salinity to Simian-3;SM:泗棉 3 号中盐处理 Treatment of medium soil-salinity to Simian-3;SH:泗棉 3 号高盐处理 Treatment of high soil-salinity to Simian-3;GL;GK19 低盐处理 Treatment of low soil-salinity to GK 19;GM;GK19 中盐处理 Treatment of medium soil-salinity to GK 19;GH;GK19 高盐处理 Treatment of high soil-salinity to GK 19;小写字母表示同列中相同棉花品种在 0.05 水平差异显著 ($P < 0.05$)

2.2 土壤盐分对转 Bt 基因棉花抗棉铃虫幼虫校正死亡率的影响

土壤盐分对转 Bt 基因棉花抗棉铃虫幼虫校正死亡率的影响如表 2。随土柱土壤盐分水平的升高,采自田间土柱中生长的棉花苗期功能叶、蕾期和花铃期蕾对位叶对棉铃虫幼虫校正死亡率呈逐渐下降趋势,下降程度随着盐分水平的增加而增加,其中苗期和蕾期叶片抗性变化差异较大,花铃期未达显著差异。

与低盐田相比,2013 年中盐田和高盐田 GK 19 棉花苗期功能叶对棉铃虫幼虫校正死亡率分别下降了 28.05%和 47.46%,蕾期分别下降了 41.50%和 45.42%,花铃期分别下降了 3.59%和 18.52%。2014 年中盐田和高盐田 GK 19 棉花功能叶对棉铃虫幼虫校正死亡率分别下降了 9.22%和 23.08%,蕾期分别下降了 31.61%和 41.07%;花铃期分别下降了 15.81%和 17.23%。表明随土壤盐分水平升高,转 Bt 基因棉花叶片对棉铃虫幼虫校正死亡率下降,下降幅度在不同时期和不同盐分处理间有所不同。

表 2 不同土壤盐分水平下转 Bt 基因棉花叶片对棉铃虫幼虫抗性死亡率的影响/%

Table 2 Effects of different soil salinity levels on the resistance of Bt cotton leaves to the larvae of cotton boll worm

处理 Treatment	2013			2014		
	苗期 Seedling stage	蕾期 Budding stage	花铃期 Flowering and bolling stage	苗期 Seedling stage	蕾期 Budding stage	花铃期 Flowering and bolling stage
低盐 Low soil-salinity	69.85±4.33 a	61.09±10.72 a	35.69±0.93 a	74.84±6.80 a	53.52±4.43 a	32.33±8.88 a
中盐 Medium soil-salinity	50.26±3.11 b	35.74±5.84 b	34.41±5.39 a	67.94±4.54 a	36.60±4.29 b	27.22±6.01 a
高盐 High soil-salinity	36.70±5.99 c	33.34±4.96 b	29.08±3.06 a	57.57±5.80 b	31.54±2.45 b	26.76±6.30 a

小写字母表示同列在 0.05 水平差异显著 ($P < 0.05$)

2.3 土壤盐分对转 Bt 基因棉花外源蛋白表达量的影响

随着棉花的生长发育进程和土壤盐分水平的升高,采自田间土柱中生长的转 Bt 基因棉花叶片中外源蛋白表达量均成逐渐下降趋势。与低盐水平相比(表 3),2013 年中盐和高盐胁迫 GK19 棉花苗期功能叶外源 Bt 蛋白表达量分别降低了 7.66% 和 23.71%;蕾期分别下降了 26.86% 和 36.85%;花铃期分别下降了 22.52% 和 41.02%。2014 年中盐和高盐胁迫 GK19 棉花苗期功能叶外源 Bt 蛋白表达量分别降低 11.52% 和 29.86%;蕾期分别下降了 3.77% 和 31.81%;花铃期分别下降了 18.13% 和 38.32%。表明土壤盐分可显著降低转 Bt 基因棉花外源蛋白表达量,但抑制程度与盐分胁迫程度和胁迫时间有关。

表 3 不同盐分土壤水平对转 Bt 基因棉花外源杀虫蛋白表达量的影响/(ng/g)

Table 3 Effects of Bt protrin contents of Bt cotton in different saline alkali soil

处理 Treatment	2013			2014		
	苗期 Seedling stage	蕾期 Budding stage	花铃期 Flowering and bolling stage	苗期 Seedling stage	蕾期 Budding stage	花铃期 Flowering and bolling stage
低盐 Low soil-salinity	297.35±9.06a	144.63±6.85a	100.72±6.61a	670.66±14.93a	134.28±9.98a	87.75±12.99a
中盐 Medium soil-salinity	274.56±10.86a	105.78±8.01b	78.04±7.73b	593.34±12.92a	129.22±9.65a	71.84±7.75a
高盐 High soil-salinity	226.85±10.96b	91.34±5.71b	59.40±3.65c	470.40±14.30b	91.56±10.04b	54.12±1.40b

小写字母表示在 0.05 水平差异显著

2.4 盐碱土壤转 Bt 基因抗虫棉对棉铃虫校正死亡率与外源 Bt 蛋白表达量的相关关系

随土壤盐分水平变化转 Bt 基因棉花对棉铃虫的抗虫性与外源 Bt 蛋白表达量呈显著的正相关关系(表 4),表明在一定土壤盐分胁迫条件下,转 Bt 基因棉花抗虫性的下降,主要可能是由于其外源 Bt 蛋白表达量降低的原因所形成。

表 4 不同土壤盐分转 Bt 基因棉花抗虫性与外源 Bt 蛋白表达量的相关性

Table 4 Relationship between the insect resistance and exogenous Bt protein expression in Saline alkali cotton field (Pearson correlation)

年份 Years	苗期 Seedling stage	蕾期 Budding stage	花铃期 Flowering and bolling stage
2013	0.892 **	0.673 *	0.699 *
2014	0.860 *	0.709 *	0.676 *

* 和 ** 代表在 0.05 和 0.01 水平差异显著

3 讨论

3.1 盐碱土壤对转 Bt 基因棉花抗虫性的影响

棉花叶片是棉铃虫取食的重要器官。转 Bt 基因棉花对棉铃虫幼虫校正死亡率越高,其对棉铃虫抗虫性越高,反之则抗虫性越低。

高温、干旱和涝渍、氮素等环境条件均能影响转 Bt 基因棉花外源蛋白的表达,进而影响其抗虫性变化。

但盐碱胁迫转 Bt 基因棉花对其抗虫效果和外源蛋白表达量的研究方面也有学者在室内通过单一 NaCl 胁迫棉花苗期进行研究。本文是在盐碱地自然条件下设置原位土柱中进行的胁迫试验,明确了盐碱土壤转 Bt 基因棉花叶片对棉铃虫的抗虫性具有时空动态性,盐分胁迫下转 Bt 基因棉花叶片对棉铃虫抗虫性下降,而 Jiang 等^[28]在室内研究结果显示 NaCl 胁迫转基因棉花苗期叶片对棉铃虫的抗性未达到显著差异水平,本文测得的转基因棉花叶片对棉铃虫的抗性程度下降,可能是由于前人是在室内幼苗期单一盐分条件下进行的试验,本文是在田间自然状态下进行的试验,田间盐分表现形式不同,盐离子种类也比较复杂,引起转基因棉花抗虫性的变化有差异;同时采样时期都是在苗期,但本文是在 5—7 叶期进行采样测定,可能与前人采样时期有差异而形成;另外前人与本试验所使用的转基因棉花品种不同,棉花品种本身蛋白含量表达量高,盐分胁迫后外源蛋白含量的下降量不足以引起抗虫性的下降,可能也是出现影响差异的原因。

3.2 盐碱土壤对转 Bt 基因棉花外源蛋白表达量的影响

转 Bt 基因棉花抗虫的物质基础是外源蛋白的表达^[32-33],Bt 蛋白的表达受棉株生长发育及环境变化的调控^[34],且对调控因素具有高度的依赖性^[35-37]。本文系统测定了采自盐碱地原位土柱种植的转 Bt 基因棉花叶片中外源蛋白表达量,表明盐碱地转 Bt 基因棉花外源蛋白表达量呈时空动态性,揭示了土壤盐分含量显著抑制了转 Bt 基因棉花外源蛋白的表达,与 Iqbal 等^[27]、李茂营^[38]在室内或盐池内采用 NaCl 胁迫棉花生长测定 Bt 蛋白质含量变化趋势一致。同时本文对土壤盐分胁迫下转基因抗虫棉花叶片中外源蛋白表达量和抗虫性两者相关关系进行分析,明确了盐碱土壤转 Bt 基因棉花叶片对棉铃虫抗虫性下降的物质机制主要是由于转 Bt 基因棉花受到盐分胁迫后其外源蛋白表达量下降而造成的,但不同盐分胁迫程度和胁迫时间,对棉花外源蛋白表达量和抗虫性影响不同。但年度间差异主要原因可能是因为取样时降雨或棉田灌溉引起盐分下移,上层土壤中盐分含量降低,在后续研究中应结合土壤肥力、土壤理化性质和气象因子(尤其是淋雨)进行系统分析;同时可能由于棉花根系较大,只测定 10—20cm 土层的土壤盐分对棉花的胁迫作用尚不够完善,需进行不同深度土壤层盐分的胁迫成都进行深入分析。

本文试验是在自然田间盐碱地进行的原位土柱试验,土柱土壤盐分与大田土壤盐分基本一致。随着棉花生育时期和季节变化规律,盐分也在不断变化,且是在整个棉花生长发育最关键的时期苗期、蕾期和花铃期进行的系统研究,此期正是棉田害虫发生的重要时期。因此该盐分胁迫试验更有利于了解盐碱地转 Bt 基因棉花的抗虫性和外源蛋白表达量在整个棉花生长季随土壤盐分水平变化的变化规律,可跟随变化的实际情况,采用栽培措施改变盐分对转基因抗虫棉的胁迫,同时需适时监测棉田棉铃虫发生种群动态,并根据监测动态进行适时防治。

4 结论

随着棉花生育进程,转 Bt 基因棉花对棉铃虫抗性校正死亡率和外源 Bt 蛋白含量呈下降趋势。盐碱土壤种植转 Bt 基因棉花对其抗棉铃虫校正死亡率和外源 Bt 蛋白表达量有显著抑制作用。本实验条件下土壤盐分水平升高,其降低幅度越明显。相关性分析表明,土壤盐分降低了转 Bt 基因棉外源杀虫蛋白表达量,致使转 Bt 基因棉花对棉铃虫抗性下降。说明盐碱土壤种植转 Bt 基因抗虫棉,外源杀虫蛋白表达量受到抑制,不利于抗虫棉对棉铃虫的抗性优势的发挥;同时由于室内离体测定结果与田间自然条件下棉花生长状态及棉田气候等造成田间棉铃虫种群动态的发生危害情况还有一定的差距,相关田间的研究报道较少,还需要监测棉田害虫发生动态,根据害虫实际消长动态情况适时进行化学防治。

参考文献(References):

- [1] Kahlown M A, Azam M. Individual and combined effect of waterlogging and salinity on crop yields in the Indus basin. *Irrigation and Drainage*, 2002, 51(4): 329-338.
- [2] Barrett-Lennard E G. The interaction between waterlogging and salinity in higher plants: causes, consequences and implications. *Plant and Soil*, 2003, 253(1): 35-54.

- [3] Norbert F, Tehiadje T. Strategies to reduce the impact of salt on crops (rice, cotton and chili) production: A case study of the tsunami-affected area of India. *Desalination*, 2007, 206(1/3): 524-530.
- [4] Ashraf M. Salt tolerance of cotton; some new advances. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 2002, 21(1): 1-30.
- [5] Meloni D A, Oliva M A, Martinez C A, Cambraia J. Photosynthesis and activity of superoxide dismutase, peroxidase and glutathione reductase in cotton under salt stress. *Environmental and Experimental Botany*, 2003, 49(1): 69-76.
- [6] Yao D X, Zhang X Y, Zhao X H, Liu C L, Wang C C, Zhang Z H, Zhang C J, Wei Q, Wang Q H, Yan H, Li F G, Su Z. Transcriptome analysis reveals salt-stress-regulated biological processes and key pathways in roots of cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Genomics*, 2011, 98(1): 47-55.
- [7] Huang J K, Hu R F, Pray C, QIAO F B, Rozelle S. Biotechnology as an alternative to chemical pesticides: a case study of Bt cotton in China. *Agricultural Economics*, 2003, 29(1): 55-67.
- [8] Mehmood Y, Farooqi Z U D, Bakhsh K, Anjum M B, Ahmad M. Impact of Bt. cotton varieties on productivity: Evidence from District Vehari, Pakistan. *Journal of Agriculture & Social Sciences*, 2012, 8: 109-111.
- [9] 李号宾, 吴孔明, 徐遥, 杨秀, 姚举, 汪飞. 新疆棉田盲蝽类害虫种群数量动态. *昆虫知识*, 2007, 44(2): 219-222.
- [10] Deguine J P, Ferron P, Russell D. Sustainable pest management for cotton production. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 2008, 28(1): 113-137.
- [11] Ali A, Desneux N, Lu Y H, Liu B, Wu K M. Characterization of the natural enemy community attacking cotton aphid in the Bt cotton ecosystem in Northern China. *Scientific Reports*, 2016, 6: 24273.
- [12] Han P, Niu C Y, Desneux N. Identification of top-down forces regulating cotton aphid population growth in transgenic Bt cotton in central China. *PLoS One*, 2014, 9(8): e102980.
- [13] Wu K, Li W, Feng H, Guo Y. Seasonal abundance of the mirids, *Lygus lucorum* and *Adelphocoris* spp. (Hemiptera: Miridae) on Bt cotton in northern China. *Crop Protection*, 2002, 21: 997-1002.
- [14] Wu K M, Guo Y Y. The evolution of cotton pest management practices in China. *Annual Review of Entomology*, 2005, 50: 31-52.
- [15] Wu K M, Lu Y H, Feng H Q, Jiang Y Y, Zhao J Z. Suppression of cotton bollworm in multiple crops in China in areas with Bt toxin-containing cotton. *Science*, 2008, 321(5896): 1676-1678.
- [16] Lu Y H, Wu K M, Jiang Y Y, Xia B, Li P, Feng H Q, Wyckhuys K A G, Guo Y Y. Mirid bug outbreaks in multiple crops correlated with wide-scale adoption of Bt cotton in China. *Science*, 2010, 328(5982): 1151-1154.
- [17] Lu Y H, Wu K M. Mirid bugs in China: pest status and management strategies. *Outlooks on Pest Management*, 2011, 22(6): 248-252.
- [18] Lu Y H, Wu K M, Jiang Y Y, Guo Y Y, Desneux N. Widespread adoption of Bt cotton and insecticide decrease promotes biocontrol services. *Nature*, 2012, 487(7407): 362-365.
- [19] Chen D H, Ye G Y, Yang C Q, Chen Y, Wu Y K. The effect of high temperature on the insecticidal properties of Bt cotton. *Environmental and Experimental Botany*, 2005, 53(3): 333-342.
- [20] Chen Y, Wen Y J, Chen Y, Cothren J T, Zhang X, Wang Y H, Payne W A, Chen D H. Effects of Extreme Air Temperature and Humidity on the Insecticidal Expression Level of Bt Cotton. *Journal of Integrative Agriculture*, 2012, 11(11): 1836-1844.
- [21] Chen Y, Chen Y, Wen Y J, Zhang X, Chen A H. The effects of the relative humidity on the insecticidal expression level of Bt cotton during bolling period under high temperature. *Field Crops Research*, 2012, 137: 141-147.
- [22] Wang L M, Wang J B, Sheng F F, Zhang X K, Liu R Z. Influences of waterlogging and drought on different transgenic Bt cotton cultivars. *Cotton Science*, 2001, 13(2): 87-90.
- [23] Martins C M, Beyene G, Hofs J L, Krüger K, Van der Vyver C, Schlüter U, Kunert K J. Effect of water-deficit stress on cotton plants expressing the *Bacillus thuringiensis* toxin. *Annals of Applied Biology*, 2008, 152(2): 255-262.
- [24] Luo Z, Dong H Z, Li W J, Zhao M, Zhu Y Q. Individual and combined effects of salinity and waterlogging on *Cry1Ac* expression and insecticidal efficacy of Bt cotton. *Crop Protection*, 2008, 27(12): 1485-1490.
- [25] Coviella C E, Stipanovic R D, Trumble J T. Plant allocation to defensive compounds: interactions between elevated CO₂ and nitrogen in transgenic cotton plants. *Journal of Experimental Botany*, 2002, 53(367): 323-331.
- [26] Pettigrew W T, Adamczyk J J. Nitrogen fertility and planting date effects on lint yield and *Cry1Ac* (Bt) endotoxin production. *Agronomy Journal*, 2006, 98(3): 691-697.
- [27] Iqbal A, Ali S, Zia M A, Zafar Y, Din J, Asad M A U, Ali G, Zafar Y. Comparative account of Bt gene expression in cotton under normal and salt affected soil. *International Journal of Agriculture and Biology*, 2013, 15(6): 1181-1186.
- [28] Jiang L J, Duan L S, Tian X L, Wang B M, Zhang H F, Zhang M C, Li Z H. NaCl salinity stress decreased *Bacillus thuringiensis* (Bt) protein content of transgenic Bt cotton (*Gossypium hirsutum* L.) seedlings. *Environmental and Experimental Botany*, 2006, 55(3): 315-320.

- [29] Hanson B R. Measuring soil salinity //Hanson B, Grattan S, Fulton A eds. Agricultural Salinity and Drainage. Davis: Department of Land, Air and Water Resources, 2006: 9-10
- [30] 中华人民共和国农业部. NY/T2162—2012 棉花抗棉铃虫性鉴定方法. 北京: 中国农业出版社, 2012.
- [31] 中华人民共和国农业部. 农业部 1943 号公告-3—2013. 转基因植物及其产品环境安全检测 抗虫棉花 第 1 部分: 对靶标害虫的抗虫性. 北京: 中国农业出版社, 2013.
- [32] Gutierrez A P, Adamczyk Jr J J, Ponsard S, Ellis C K. Physiologically based demographics of Bt cotton-pest interactions: II. Temporal refuges, natural enemy interactions. *Ecological modelling*, 2006, 191(3/4): 360-382.
- [33] Bakhsh A, Shahzad K, Husnain T. Variation in the spatio-temporal expression of insecticidal genes in cotton. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*, 2011, 47(1): 1-9.
- [34] Torres J B, Ruberson J R, Adang M J. Expression of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac protein in cotton plants, acquisition by pests and predators: a tritrophic analysis. *Agricultural and Forest Entomology*, 2006, 8(3): 191—202.
- [35] Adamczyk Jr J J, Sumerford D V. Potential factors impacting season-long expression of Cry1Ac in 13 commercial varieties of Bollgard © cotton. *Journal of Insect Science*, 2001, 1: 13.
- [36] Johnson J T, Pettigrew W T. Effects of mepiquat pentaborate on cotton cultivars with different maturities. *Journal of Cotton Science*, 2006, 10(2): 128-135.
- [37] Dong H Z, Li W J. Variability of Endotoxin Expression in Bt Transgenic Cotton. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 2007, 193(1): 21-29.
- [38] 李茂营. NaCl 胁迫对转基因抗虫棉生长和抗虫性影响及化学调控修复[D]. 北京: 中国农业大学, 2014.