

转 *cry1 Ab* 基因水稻中毒蛋白的表达、分泌及其在土壤中的残留

吴立成¹, 李啸风², 叶庆富^{1*}, 汪海燕¹

(1. 浙江大学原子核农业科学研究所, 杭州 310029, E-mail: qfye@zju.edu.cn; 2. 浙江大学化学系, 杭州 310029)

摘要: 研究了转 *cry1 Ab* 基因水稻(克螟稻)中 Cry1 Ab 毒蛋白的表达、根系分泌及其在土壤中的残留规律。结果表明,分蘖始期至成熟期,克螟稻地上部和根部中的 Cry1 Ab 毒蛋白的表达量(FW)分别为 3.23 ~ 8.22 $\mu\text{g/g}$ 和 0.68 ~ 0.89 $\mu\text{g/g}$ 。生育期间克螟稻根系分泌的 Cry1 Ab 毒蛋白含量仅为 1.66 ~ 48.02 ng/(株·d)。试验证实,克螟稻根际土中的 Cry1 Ab 毒蛋白残留含量低于检测限(<0.5 ng/g 干燥土)。生物测定还表明,克螟稻根际土及其提取液对棉铃虫初孵幼虫和 3 龄幼虫不产生致死性效应。相对于 Cry1 Ab 毒蛋白的根系分泌转移,克螟稻秸秆还田对土壤环境的影响应引起重视。

关键词: 转 *cry1 Ab* 基因水稻; Cry1 Ab 毒蛋白; 表达; 根系分泌; 土壤; 残留

中图分类号: X53 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2004)05-0116-06

Expression and Root Exudation of Cry1Ab Toxin Protein in *cry1 Ab* Transgenic Rice and Its Residue in Rhizosphere Soil

WU Li-cheng¹, LI Xiao-feng², YE Qing-fu¹, WANG Hai-yan¹

(1. Institute of Nuclear Agricultural Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China E-mail: qfye@zju.edu.cn; 2. Department of Chemistry, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

Abstract: The expression and root exudation of Cry1 Ab toxin protein in *cry1 Ab* transgenic rice (KMD) and its residue in rhizosphere soil were investigated. The results showed that content of Cry1 Ab toxin protein in the shoot and root of KMD were 3.23 ~ 8.22 and 0.68 ~ 0.89 $\mu\text{g/g}$ from early tillering to maturing stage, respectively. The content of the Cry1 Ab toxin proteins via root exudation were 1.66 ~ 48.02 ng/(individual·d) at that phase. The results also demonstrated that the residue of the Cry1 Ab toxin protein in rhizosphere soil was less than detectable level(0.5 ng/g air dried soil). In addition, insecticidal bioassay indicated that rhizosphere soil and its extraction solution had no significant effect on mortality of first- and third- instar larvae of cotton bollworm (*Heliothis armigera*). It suggested that the KMD straws returned to the field might have the higher potential environmental risk than the root exudation.

Key words: *cry1 Ab* transgenic rice; Cry1 Ab toxin protein; expression; root exudation; soil; residue

水稻生产受稻螟虫和稻纵卷叶螟等鳞翅目害虫的严重威胁^[1]。转基因技术的发展为水稻螟害的防治提供了新的途径。舒庆尧等^[2]、项友斌等^[3]将 *Bt* (*Bacillus thuringensis*) 基因(*cry1 Ab*) 导入秀水-11 (Xiushui-11) 等水稻品种中,育成了高抗多种鳞翅目害虫的转 *Bt* 基因水稻新品系克螟稻(KMD)^[4]。2000 年, Tu 等^[5]也获得了纯合的转 *Bt* 基因水稻新品系(Shanyou63 和 Minghui63)。由于转基因植物可能存在潜在的生态风险性和环境污染等问题^[6~18],已引起世界各国科学家的高度重视。转 *Bt* 基因植物中的 *Bt* 毒蛋白若在土壤中积累,则可能造成两方面的不利影响:一是使靶标害虫的选择压增加,对 *Bt* 毒蛋白产生抗性;二是有可能对害虫天敌等非靶标生物的生长、发育等造成不良影响。目前,国内外有关转 *Bt* 基因作物的生态风险性研究,其对象主要为 *Bt* 玉米、*Bt* 棉花以及 *Bt* 马铃薯等旱田作

物^[19~21]。Donegan 等^[20,22]研究表明, *Bt* 棉花枝叶埋入 5 种不同微生态系统,140d 后,3 种土壤中仍能检测到 *Bt* 毒蛋白。Stotzky 等^[23~31]发现, *Bt* 玉米的根系能分泌 Cry1 Ab 毒蛋白,而且该毒蛋白能快速地与土壤基质结合,持留期可长达 234d 且保留杀虫活性,较之游离态更难被生物降解。但迄今为止,国内外有关转 *Bt* 基因(*cry1 Ab*) 水稻 Cry1 Ab 毒蛋白的时空表达、根系分泌及其在土壤中的残留等研究鲜见报道。

本文以转 *cry1 Ab* 基因水稻(克螟稻)及其非转基因亲本秀水-11 为试材,在大田和实验室条件下研究了克螟稻不同生育期 Cry1 Ab 毒蛋白的表达、

收稿日期: 2003-11-06; 修订日期: 2004-02-16

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(20177021, 30070156)

作者简介: 吴立成(1976~), 男, 硕士研究生, 研究方向为分子与环境生物物理学。

* 通讯作者

根系分泌及其在根际土壤中的残留规律,为克螟稻的环境安全性评价提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

试验水稻为转 *cry1 Ab* 基因水稻(克螟稻, KMD)及其非转基因亲本(秀水 11, Xiushui 11)。克螟稻为第 12 代转 *cry1 Ab* 基因纯合株系^[2]。经喂虫试验表明克螟稻对 8 种鳞翅目害虫具有 100% 的致死率^[4]。供试土壤为华家池的黄松土。基本理化性质为:有机碳 14.1 g/kg,水解性氮 115.5 mg/kg,速效磷 25.2 g/kg,速效钾 58.5 mg/kg, pH(H₂O) 为 7.0。

1.2 试验方法

1.2.1 水稻田间培养及根系和地上部的 *Cry1 Ab* 毒蛋白测定

按统计学设计田间小区(小区面积 0.0200 hm², 3 个重复),分别移栽克螟稻和非转基因亲本秀水 11。于分蘖始期、分蘖盛期、分蘖末期、孕穗期、抽穗期、灌浆期和成熟期采样分析,每个生育期取样一次,每次随机取克螟稻和非转基因亲本各 18 株(每小区各 6 株)。用清水洗净根际土。地上部和根系剪成小段,分别放入小型磨粉机中,用液氮冷冻后磨粉,装入封口袋中放入 -70℃ 超低温冰箱(Revco, 美国)中备用。分别称取 100.0 mg 已磨好的地上部和根系粉于 5 mL 离心管中,加入 1 mL 提取液(Envirologix Inc., 美国),室温振荡提取 1 h,离心 5 min (12000 r/min),取上清液,重复提取 3 次,合并上清液。提取液稀释(40~80 倍)后,取 100 μL 加入到已包埋好抗体的 96 孔板中,同时加入不同浓度(0、0.5、2.5 和 5.0 ng/mL)的 *Cry1 Ab* 毒蛋白标准溶液,测定步骤按 Envirologix 公司提供的方法进行。用酶标仪(Spectron Max 190, 德国)测定,波长为 450 nm,依据标准曲线和提取液稀释倍数计算出地上部和根系的 *Cry1 Ab* 毒蛋白含量。

1.2.2 水稻根际土中 *Cry1 Ab* 毒蛋白的提取与测定

取克螟稻和非转基因亲本各 18 株,分别放在搪瓷盘上自然风干 24 h,然后轻轻抖去根系上多余的浮土,取附着在根系上的土(根际土),过筛(100 目)并仔细去掉其中的微小细根,装入封口袋,于 -70℃ 下保存备用。称取 500.0 mg 土到 5 mL 离心管中,加入 1 mL 专用提取液(0.1 mol/L Na₂CO₃ + 0.1 mol/L NaHCO₃ (pH 10) + 5 mmol/L EDTA + 50 mmol/L

Na₄P₂O₇·10H₂O + 适量表面活性剂),振荡提取 1 h,离心 5 min (12 000 r/min),取上清液,重复提取 3 次,合并上清液。余下 *Cry1 Ab* 毒蛋白测定步骤同 1.2.1。

1.2.3 水稻根系分泌物中的 *Cry1 Ab* 毒蛋白的测定

另取克螟稻和非转基因亲本各 18 株,洗净根系(注意不要损伤根系),分别放到 200 mL 的烧杯中,加入水稻培养液(国际水稻研究所研制的水稻培养液) 100 mL,室温下培养 24 h,培养期间保持培养液体积不变。取全部培养液,在冷冻干燥机(Virtis Benchtop 4K, 美国)中浓缩,定容至 2 mL。余下 *Cry1 Ab* 毒蛋白测定步骤同 1.2.1。

1.2.4 根际土及其提取液对棉铃虫(初孵幼虫和三龄幼虫)的致死率分析

分别称取 5.0 g 克螟稻和非转基因亲本根际土(设 3 次重复),采用 1.2.2 方法提取土壤中的 *Cry1 Ab* 毒蛋白,合并提取液,透析袋脱盐后,浓缩并定容至 10 mL。吸取 200 μL 提取液加入到装有 2 g 人工饲料的小瓶中,分为 3 组,每组 10 个养虫瓶,每瓶饲喂 1 头棉铃虫(初孵幼虫),每份土壤样品共处理 30 头棉铃虫。同时,按同法饲喂三龄幼虫。另称取 100.0 mg 克螟稻和非转基因亲本根际土(设 3 次重复),参照 Tapp 等^[25]的方法,直接喂养棉铃虫,喂虫试验设 3 组,每组 10 头棉铃虫,每份土壤样品共处理 30 头棉铃虫。棉铃虫室温培养一周(光照周期,光:暗 = 16:8)后调查死亡率。

2 结果与分析

2.1 克螟稻植株地上部和根系中 *Cry1 Ab* 毒蛋白随时间的变化规律

由表 1 可见,克螟稻植株地上部 *Cry1 Ab* 毒蛋白的表达量,分蘖始期与盛期之间以及分蘖末期与孕穗期之间均无显著性的差异,但分蘖末期和孕穗期地上部 *Cry1 Ab* 毒蛋白的表达量显著高于分蘖始期和分蘖盛期($p < 0.01$)。从孕穗期到灌浆期,克螟稻地上部 *Cry1 Ab* 毒蛋白的表达量持续增加,至灌浆期达到最大量,灌浆期以后维持在较高水平(8.22 μg/g)。由表 2 可见,克螟稻根系中 *Cry1 Ab* 毒蛋白的表达量从分蘖始期到成熟期,差异不显著,其表达量远低于地上部,约为后者的 1/10~1/4。表 1 和表 2 结果还表明,非转基因亲本(秀水 11)不论是地上部还是根系中均检测不到 *Cry1 Ab* 毒蛋白的存在(<0.5 ng/g)。

表 1 克螟稻地上部中 Cry1Ab 毒蛋白随时间的变化 (FW)¹⁾/μg·g⁻¹

Table 1 Changes of Cry1 Ab content in shoot of KMD from early tillering to maturing stage (FW)/μg·g ⁻¹							
时间	分蘖始期	分蘖盛期	分蘖末期	孕穗期	抽穗期	灌浆期	成熟期
time	early tillering	flourish tillering	final tillering	booting	heading	seed filling	maturing
克螟稻 KMD	3.48 ± 0.11	3.23 ± 0.33	4.21 ± 0.14	4.26 ± 0.31	6.06 ± 0.69	8.22 ± 0.91	7.98 ± 0.88
非转基因亲本 non- Bt rice	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd

1) Nd 表示 Cry1 Ab 毒蛋白含量低于检测限(< 0.5ng/g)

表 2 克螟稻根系中 Cry1Ab 毒蛋白随时间的变化 (FW)¹⁾/μg·g⁻¹

Table 2 Changes of Cry1 Ab content in root of KMD from early tillering to maturing stage(FW)/μg·g ⁻¹							
时间	分蘖始期	分蘖盛期	分蘖末期	孕穗期	抽穗期	灌浆期	成熟期
time	early tillering	flourish tillering	final tillering	booting	heading	seed filling	maturing
克螟稻 KMD	0.88 ± 0.02	0.89 ± 0.07	0.84 ± 0.03	0.83 ± 0.04	0.68 ± 0.08	0.80 ± 0.07	0.85 ± 0.03
非转基因亲本 non- Bt rice	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd

1) Nd 表示 Cry1 Ab 毒蛋白含量低于检测限(< 0.5ng/g)

舒庆尧等研究表明,克螟稻叶片对 8 种鳞翅目害虫具有 100 %的致死率^[41].由于克螟稻地上部具有较高含量的 Cry1 Ab 毒蛋白,达到了棉铃虫(*Heliothis armigera*)和烟青虫(*Manduca sexta*) 幼虫的半致死剂量值^[23,32](μg 级).因此,从环境安全性角度出发,应尽量避免克螟稻秸秆还田以防止植株中 Cry1 Ab 毒蛋白在土壤中积累.

2.2 克螟稻中 Cry1 Ab 毒蛋白的分泌规律及其在根际土中的积累

由表 3 可见,从分蘖始期到成熟期,非转基因亲本(秀水 11)的根系分泌物中检测不到 Cry1 Ab 毒蛋

白.克螟稻根系分泌物中虽可检测到 Cry1 Ab 毒蛋白,但其每株日分泌量仅为 1.66ng ~ 48.02ng.表 3 结果还表明,克螟稻根系日分泌 Cry1 Ab 毒蛋白的量从分蘖始期至分蘖末期一直呈上升趋势,至分蘖末期达到最大值,随后日分泌量显著下降,至抽穗期后维持在较低水平.依据上述结果推算,从分蘖始期到成熟期(少于 85 d),每株克螟稻通过根系分泌的 Cry1 Ab 毒蛋白的总量至多只能达到 μg 级水平.由此可见,克螟稻中的 Cry1 Ab 毒蛋白不易通过根系分泌途径向土壤环境转移.

由表 4 可见,不同生育期(分蘖始期至成熟期)

表 3 克螟稻根系分泌物中 Cry1Ab 毒蛋白随时间的变化 (FW)¹⁾/ng·(株·d)⁻¹

Table 3 Changes of Cry1 Ab content in root exudates of KMD and Non- Bt rice from early tillering to maturing stage/ng·(individual·d) ⁻¹							
时间	分蘖始期	分蘖盛期	分蘖末期	孕穗期	抽穗期	灌浆期	成熟期
time	early tillering	flourish tillering	final tillering	booting	heading	seed filling	maturing
克螟稻 KMD	7.43 ± 2.18	13.33 ± 3.25	48.02 ± 6.65	27.55 ± 7.16	11.33 ± 4.32	2.67 ± 1.26	1.66 ± 1.15
非转基因亲本 non- Bt rice	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd

1) Nd 表示 Cry1 Ab 毒蛋白含量低于检测限(< 0.5ng/ mL)

克螟稻根际土提取液中均检测不到 Cry1 Ab 毒蛋白 [< 0.5ng/g 土,本研究采用的提取方法,对土壤中 Cry1 Ab 的提取效率达 80 %,明显高于 Envirolorigx 现有提取法的效率(< 20 %)],这与克螟稻根系分泌 Cry1 Ab 毒蛋白量少(表 3)的结果是相吻合的.克螟稻表达的 Cry1 Ab 毒蛋白难以通过根系分泌途径向土壤环境转移和形成残留,这一结果与 Stotzky 等^[23,30]有关转基因 Bt 玉米的表达蛋白(也为 Cry1 Ab 毒蛋白)易在土壤中形成残留的试验结论明显不同.究其原因,可能由 2 个方面引起:一是作物种类不同, *cry1Ab* 基因的表达量以及根系分泌

Cry1 Ab 毒蛋白的能力可能不同;二是作物生长环境不同,Cry1 Ab 毒蛋白的降解规律与残留特性可能不同.试验结果还表明,仅从根系分泌 Cry1 Ab 毒蛋白角度看,较之 Bt 玉米^[23],生育期间克螟稻对土壤环境的影响相对较小.

2.3 克螟稻根际土及其提取物对棉铃虫的致死效应

由表 5 和表 6 可知,较之非转基因亲本的根际土及其提取液,饲料对照和提取液对照,克螟稻根际土及其提取液对棉铃虫初孵幼虫和 3 龄幼虫的致死率均无显著性差异.这一结果表明,在生育期间的

表 4 不同生育期克螟稻根际土(风干土)中的 Cry1Ab 毒蛋白含量¹⁾/ ng·g⁻¹

Table 4 Cry1 Ab content in rhizosphere soil (air dried soil) of KMD and Nonr Bt rice from early tillering to maturing stage/ ng·g ⁻¹							
时间	分蘖始期	分蘖盛期	分蘖末期	孕穗期	抽穗期	灌浆期	成熟期
time	early tillering	flourish tillering	final tillering	booting	heading	seed filling	maturing
克螟稻 KMD	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
非转基因亲本 Nonr Bt rice	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd

1) Nd 表示 Cry1 Ab 毒蛋白含量低于检测限(<0. 5ng/ g ,air dried soil) .

表 5 不同生育期克螟稻和非转基因亲本的根际土及其提取液对棉铃虫初孵幼虫的致死率/ %

Table 5 Mortality of first instar larvae of cotton bollworm (<i>Heliochis armigera</i>) feeded with rhizosphere soil and its extraction solution respectively in different growing period of KMD and Non- <i>Bt</i> rice/ %										
时间	分蘖始期	分蘖盛期	分蘖末期	孕穗期	抽穗期	灌浆期	成熟期			
time	early tillering	flourish tillering	final tillering	booting	heading	seed filling	maturing			
克螟稻根际土	30 .00 ±3 .33	28 .89 ±3 .85	27 .78 ±1 .92	28 .89 ±1 .92	27 .78 ±5 .09	30 .00 ±3 .33	31 .11 ±1 .92			
KMD rhizosphere soil										
非转基因亲本根际土	27 .78 ±5 .09	27 .78 ±1 .92	28 .89 ±6 .94	27 .78 ±3 .85	30 .00 ±5 .77	28 .89 ±7 .07	26 .67 ±3 .33			
Non- <i>Bt</i> rice rhizosphere soil										
克螟稻根际土提取液	27 .78 ±6 .94	30 .00 ±3 .33	28 .89 ±5 .09	27 .78 ±7 .70	26 .67 ±5 .77	28 .89 ±9 .62	27 .78 ±5 .09			
Extraction solution from KMD rhizosphere soil										
非转基因亲本根际土提取液	26 .67 ±5 .77	28 .89 ±3 .85	27 .78 ±6 .94	26 .67 ±6 .67	31 .11 ±1 .92	26 .67 ±8 .82	27 .78 ±3 .85			
Extraction solution from Non- <i>Bt</i> rice rhizosphere soil										
饲料对照										
feed control				28 .89 ±3 .85						
提取液对照				27 .78 ±1 .92						
Extraction solution control										

表 6 不同生育期克螟稻和非转基因亲本的根际土及其提取液对棉铃虫 3 龄幼虫的致死率/ %

Table 6 Mortality of third instar larvae of cotton bollworm (<i>Heliochis armigera</i>) feeded on rhizosphere soil and its extraction solution respectively in different growing period of KMD and Non- <i>Bt</i> rice/ %							
时间 time	分蘖始期 early tillering	分蘖盛期 flourish tillering	分蘖末期 final tillering	孕穗期 booting	抽穗期 heading	灌浆期 seed filling	成熟期 maturing
克螟稻根际土 KMD rhizosphere soil	2 .22 ±1 .92	0 ±0 .00	0 ±0 .00	0 ±0 .00	0 ±0 .00	0 ±0 .00	0 ±0 .00
非转基因亲本根际土 Non- <i>Bt</i> rice rhizosphere soil	0 ±0 .00	0 ±0 .00	2 .22 ±1 .92	0 ±0 .00	0 ±0 .00	1 .11 ±1 .92	0 ±0 .00
克螟稻根际土提取液 Extraction solution from KMD rhizosphere soil	0 ±0 .00	1 .11 ±1 .92	0 ±0 .00	0 ±0 .00	2 .22 ±1 .92	0 ±0 .00	0 ±0 .00
非转基因亲本根际土提取液 Extraction solution from Non- <i>Bt</i> rice rhizosphere soil	0 ±0 .00	0 ±0 .00	0 ±0 .00	1 .11 ±1 .92	0 ±0 .00	0 ±0 .00	2 .22 ±1 .92
饲料对照 feed control				1 .11 ±1 .92			
提取液对照 Extraction solution contro				0 ±0 .00			

克螟稻根际土中,其 Cry1 Ab 毒蛋白的残留量不足以对棉铃虫初孵幼虫(对 Cry1 Ab 毒蛋白非常敏感)和 3 龄幼虫产生致死性效应.前已述及,从分蘖始期至成熟期,克螟稻根际土中的 Cry1 Ab 毒蛋白含量低于检测限,而 Cry1 Ab 毒蛋白对棉铃虫初孵幼虫的半致死剂量为 μg 级^[23 ,32],因此,克螟稻根际土及其提取液对棉铃虫不产生致死性效应这一结果与 2. 3 的试验结论是相符的.

3 讨论

研究表明,从分蘖始期至成熟期,克螟稻根系分泌 Cry1 Ab 毒蛋白的量较低(表 3),在其根际土中检测不到 Cry1 Ab 毒蛋白的残留(表 4).生物测定还表明,克螟稻根际土中的 Cry1 Ab 毒蛋白的残留量不足以对鳞翅目昆虫产生致死性效应(表 5 和表 6).因此,仅从根系分泌 Cry1 Ab 毒蛋白及其在土壤中

的残留特性角度看,较之转 *Bt* 玉米^[23~31],克螟稻表达的 CryI Ab 毒蛋白对土壤生态系统的不良影响相对较小.刘忠诚等^[33]的研究也表明,生育期间的克螟稻不会对田间捕食蜘蛛有影响.

本课题组早先的研究结果(另文发表)表明,在整个生育期,根际土中的细菌数量,克螟稻显著低于其非转基因亲本,而真菌则反之.由于根系分泌物中的 CryI Ab 毒蛋白含量很低,而且根际土中检测不到 CryI Ab 毒蛋白的残留,因此,克螟稻根际土中的细菌数量的显著下降和真菌数量的显著增加不太可能由 CryI Ab 毒蛋白直接引起,而可能是由于克螟稻根系分泌物中的其它物质组成(如有机酸种类和含量、次生代谢物及其选择标记基因的表达产物——潮霉素酸转移酶和新霉素磷酸转移酶)与非转基因亲本的不同所导致.笔者新近的研究结果(另文发表)表明,克螟稻根系分泌物中的有机酸(主要为酒石酸)的含量显著低于其非转基因亲本.Oger 等^[34]研究也表明,转基因豆类植物根系分泌物对根际土中细菌数量和群落的影响,主要由根系分泌物中的冠瘿碱所引起.

值得注意的是,尽管克螟稻不易通过根系分泌途径向土壤转移 CryI Ab 毒蛋白,但由于其植株中毒蛋白表达量较高(μg 级),而且叶片对 8 种鳞翅目害虫有 100 % 的致死率^[4].因此,若克螟稻的秸秆全部还田,则单季约有 $60\text{g} \sim 120\text{g}/\text{hm}^2$ 的纯 CryI Ab 毒蛋白[按 hm^2 生物量约 15 000kg(FW)折算]转移到土壤环境,这些毒蛋白可能与土壤基质(腐殖质、粘粒、蒙脱石和高岭石等)结合形成结合态残留,并保留生物活性^[23~31].土壤中 CryI Ab 毒蛋白的积累,一方面可能使靶标害虫对该毒蛋白的选择压增加,从而增加抗性,缩短转 *cryI Ab* 基因作物的应用时间;另一方面可能对其它非靶标生物(包括害虫天敌、传粉昆虫、动物、其它原生动物等)的生长、发育等造成不利暂时性影响.吴伟祥等^[35,36]研究表明:淹水条件下,添加(3 % 添加量)克螟稻秸秆的土壤中的真菌数量,在培养后期(培养 28d 后)明显低于添加非转基因亲本秸秆的土壤;土壤脱氢酶活性,在培养初期(7~14d),添加克螟稻秸秆显著高于添加亲本秸秆(活性前者约是后者的 1.95 倍),但培养后期(21~49d),情况正好相反(活性前者仅为后者的 68 %);产甲烷细菌和厌氧菌活性在培养 7~56d 时显著低于非转基因亲本的土壤,而培养 56d 后,则反之.王洪兴等^[37]的研究也表明,在好气条件下,添加(4 % 添加量)克螟稻秸秆土壤中的细菌数量和反硝

化细菌的活性明显低于添加非转基因亲本秸秆的土壤;而对真菌的影响则反之.由此可见,克螟稻秸秆还田后,其对土壤微生物和土壤酶活性都有不同程度的暂时性影响.Donegan^[21]曾报道,转 *Bt* 棉花叶还田后对土壤微生物也会产生的不同影响.因此,在克螟稻规模化生产时,其秸秆还田问题应该引起足够的重视.有关克螟稻秸秆中的 CryI Ab 毒蛋白在土壤环境中的环境行为与归趋,仍有待于进一步的 research.

致谢:克螟稻原创研究由浙江大学原子核农业科学研究所舒庆尧教授、高明尉教授与加拿大 Ottawa 大学 Illimar Altosaar 教授合作完成.环境释放试验由本所吴殿星博士负责,舒庆尧教授提供了本研究克螟稻试材,在此一并感谢.

参考文献:

- [1] Maagd R A, Bosch D, Stieckma W. *Bacillus thuringiensis* toxin-mediated insect resistance in plants [J]. Trends in plant science, 1999, 4(1): 9~13.
- [2] 舒庆尧,叶恭银,崔海瑞,等. *Bt* 转基因水稻克螟稻选育[J]. 浙江农业大学学报, 1998, 24(6): 579~580.
- [3] 项友斌,梁竹青,高明尉,等. 农杆菌介导的苏云金杆菌抗虫基因 *cryI Ab* 和 *cryI Ac* 在水稻中的遗传转化及蛋白表达[J]. 生物工程学报, 1999, 15(4): 495~500.
- [4] Shu Q, Ye G, Cui H, et al. Transgenic rice plants with a synthetic *cryI Ab* gene from *Bacillus thuringiensis* were highly resistant to eight lepidopteran rice pest species [J]. Molecular Breeding, 2000, (6): 433~439.
- [5] Tu J, Zhang G, Datta K, et al. Field performance of transgenic elite commercial hybrid rice expressing *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin [J]. Nature Biotechnology, 2000, 18: 1101~1104.
- [6] Losey J E, Rayer L S, Carter M E. Transgenic pollen harms monarch larvae [J]. Nature, 1999, 399: 214.
- [7] Wolfenbarger L L, Phifer P R. The ecological risks and benefits of genetically engineered plants [J]. Science, 2000, 290: 2088.
- [8] 闻大中. 基因工程生物的生态影响及其评价[J]. 应用生态学报, 1992, 3(4): 371~377.
- [9] Conner T. Food safety issues relating to genetic engineering of crop plants [J]. Agricultural Science, 1993, 6(3): 36~41.
- [10] Cowell R K. Potential ecological and evolutionary problems of introducing transgenic crops into the environment [A]. In: Krattiger AF, et al. Biosafety for sustainable agriculture: Sharing biotechnology regulatory experiences of the western hemisphere ISAAA and SEI [C]. Stockholm, 1994. 33~46.
- [11] Kjellsson G, Simonsson V. Methods for risk assessment of transgenic plants. I. Competition, establishment and ecosystem effects [M]. Birkhauser Verlag, 1994. 1~214.
- [12] Trevors J T, Kuikman P, Watson B. Transgenic plants and biogeochemical cycles [J]. Molecular Ecology, 1994, 3(1): 57~64.

- [13] Abbott A. Transgenic trials under pressure in Germany [J]. Nature, 1996, **380**:94.
- [14] 贾士荣. 转基因作物的安全性争论及其对策[J]. 生物技术通报, 1999, (6):1~7.
- [15] 钱迎倩, 田彦. 转基因植物的生态风险评价[J]. 植物生态学报, 1998, **22**(4):289~299.
- [16] Conner A J, Jacobs M E. Genetic engineering of crops as potential source of genetic hazard in the human diet [J]. Mutation Res. Gene Toxic and Envir. Mutag, 1999, **443**(1):223~234.
- [17] 王忠华, 叶庆富, 舒庆尧, 等. 转基因植物根系分泌物对土壤微生物生态的影响[J]. 应用生态学报, 2002, **13**(3):373~375.
- [18] 叶庆富. 同位素示踪技术与转基因植物生态风险性评价研究[J]. 核农学报, 2003, **17**(4):313~318.
- [19] Saxena D, Stotzky G. *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) toxin released from root exudates and biomass of *Bt* corn has no apparent effect on earthworms, nematodes, protozoa, bacteria, and fungi in soil [J]. Soil Biol. Biochem, 2001, **33**:1225~1230.
- [20] Donegan K K, Seidler R J. Effects of transgenic plants on soil and plant microorganisms [J]. Recent Research Development in Microbiology, 1999, **3**:415~424.
- [21] Donegan K K, Palm C J, Fieland V J, *et al.* Changes in levels, species, and DNA fingerprints of soil microorganisms associated with cotton expressing the *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* endotoxin [J]. Appl. Soil Ecol., 1995, **2**:111~124.
- [22] Palm C J, Schaller D L, Donegan K K, *et al.* Persistence in soil of transgenic plant produced *Bacillus thuringiensis* Var. *Kurstaki* delta-endotoxin [J]. Canadian J. of Microbiology, 1996, **42**(12):1258~1262.
- [23] Saxena D, Flores S, Stotzky G. Insecticidal toxin in root exudates from *Bt* corn [J]. Nature, 1999, **402**:445~562.
- [24] Saxena D, Stotzky G. Insecticidal toxin from *Bacillus thuringiensis* is released from roots of transgenic *Bt* corn in vitro and in situ [J]. FEMS Microbiology Ecology, 2000, **33**:35~39.
- [25] Tapp H, Calamai L, Syotzky G. Adsorption and binding of the insecticidal protein of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* and subsp. *tenebrionis* on clay minerals [J]. Soil Biol. Biochem., 1994, **26**:663~679.
- [26] Tapp H, Stotzky G. Insecticidal activity of the toxins from *Bacillus thuringiensis* subspecies *kurstaki* and *tenebrionis* adsorbed and bound on pure and soil clays [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1995, **61**(5):1786~1790.
- [27] Tapp H, Stotzky G. Monitoring the fate of insecticidal toxins from *Bacillus thuringiensis* in soil with flow cytometry [J]. Can. J. Microbiol., 1997, **43**:1074~1078.
- [28] Koskella J, Stotzky G. Microbial utilization of free and clay-bound insecticidal toxins from *Bacillus thuringiensis* and their retention of insecticidal activity after incubation with microbes [J]. Appl. Environ. Microbiol., 1997, **63**:3561~3568.
- [29] Tapp H, Stotzky G. Persistence of the insecticidal toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* in soil [J]. Soil Biol. Biochem., 1998, **30**(4):471~476.
- [30] Crecchio C, Stotzky G. Insecticidal activity and biodegradation of the toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* bound to humic acids from soil [J]. Soil Biol. Biochem., 1998, **30**:463~470.
- [31] Venkateswerlu G, Stotzky G. Binding of the protoxin and toxin protein of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* on clay minerals [J]. Curr. Microbiol., 1992, **25**:1~9.
- [32] 乐超银, 鲁松清, 刘子铎, 等. 转化 *CryI C* 基因对苏云金芽胞杆菌杀虫活性的影响[J]. 微生物学通报, 2002, **29**(3):17~20.
- [33] 刘志诚, 叶恭银, 胡萃, 等. *Bt* 水稻对主要非靶标害虫和蜘蛛优势种田间种群动态的影响[J]. 植物保护学报, 2002, **29**(2):138~144.
- [34] Oger P, Petit A, Dessaux Y. Genetically engineered plants producing opines alter their biological environment [J]. Nature Biotechnol., 1997, **15**:369~372.
- [35] Wu Weixiang, Ye Qingfu, Min Hang, *et al.* *Bt* transgenic rice straw affects the culturable microbiota and dehydrogenase and phosphatase activities in a flooded paddy soil [J]. Soil biology and biochemistry, 2003, **2**(36):289-295.
- [36] 吴伟祥, 叶庆富, 闵航. 不同生长期转 *Bt* 基因水稻秸秆还土对淹水土壤酶活性的影响[J]. 生态学报, 2003, **23**(11):2354~2358.
- [37] 王洪兴, 陈欣, 唐建军, 等. 转 *Bt* 基因水稻秸秆降解及对土壤可培养微生物类群的影响[J]. 生态学报, 2004, **24**(1):89~94.