

转 *Bt* 基因抗虫棉对根际土壤 *Bt* 蛋白 残留和速效养分含量的影响

陈彦君^{1,2}, 任梦云^{1,3}, 关 潇¹, 朱文娟¹, 沈 奇^{1,2}

(1. 中国环境科学研究院, 北京 100012; 2. 海南大学热带农林学院, 海南海口 570228;

3. 浙江省农业科学院作物与核技术利用研究所, 浙江 杭州 310021)

摘 要:以 4 个品种转 *Bt* 基因抗虫棉及其对照常规棉为研究对象, 采用 ELISA 试剂盒法检测其不同生育期根际土壤 *Bt* 蛋白残留, 同时比较速效养分含量的变化。结果表明: (1) 棉花根际土壤中 *Bt* 蛋白的残留量在蕾期达到最大; 在整个生育期 4 个品种转基因抗虫棉根际土壤中 *Bt* 蛋白的含量均显著高于对照常规棉 ($P < 0.05$), 其中鲁棉研 28 号在蕾期显著高于对照常规棉 1 029.66%, 鲁棉研 36 号在蕾期显著高于对照常规棉 2 573.45%, 山农棉 8 号在苗期显著高于对照常规棉 1 208.89%, 鑫秋 4 号在花铃期显著高于对照常规棉 793.18%。 (2) 棉花根际土壤中硝态氮含量在苗期最高, 吐絮期最低, 且在部分生育期转基因抗虫棉与对照常规棉差异显著; 铵态氮含量在苗期最高, 吐絮期最低, 4 个品种转基因抗虫棉在蕾期、花铃期均与对照常规棉差异显著; 速效磷含量在苗期最低, 吐絮期最高, 其中鲁棉研 28 号在蕾期显著高于对照常规棉 10.29%, 鲁棉研 36 号在苗期显著高于对照常规棉 6.77%。研究表明, 转基因抗虫棉的种植和生育期是影响棉花根际 *Bt* 蛋白残留量、速效养分含量的主要因子。

关键词: 转 *Bt* 基因抗虫棉; 根际土壤; *Bt* 蛋白; 速效养分含量

中图分类号: S562 文献标志码: A

Influence of insect-resistant transgenic *Bt* cotton on *Bt* protein residue and available nutrient contents in rhizosphere soil

CHEN Yan-jun^{1,2}, REN Meng-yun^{1,3}, GUAN Xiao¹, ZHU Wen-juan¹, SHEN Qi^{1,2}

(1. Chinese Research Academy of Environmental Sciences, Beijing 100012, China;

2. Institute of Tropical Agriculture and Forestry, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China;

3. Institute of Crops and Nuclear Technology Utilization, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences,
Hangzhou, Zhejiang 310021, China)

Abstract: Here we have detected residues of *Bt* protein in the rhizosphere soil of four transgenic *Bt* cottons and non-*Bt* cottons varieties at different growth stages with ELISA kit, and the changes of available nutrient content were compared at the same time. Results showed that: (1) *Bt* protein content reached the maximum in squaring stage. In the whole growth period, the *Bt* protein content in rhizosphere soil of four varieties of transgenic cottons were significantly higher than no-*Bt* cotton ($P < 0.05$). The *Bt* protein content of Lumian No.28 was significantly higher than that in the conventional cotton 1 029.66% in squaring stage, the protein of Lumian No.36 was significantly higher than that in the conventional cotton 2 573.45% in squaring stage, Shannong No.8 was significantly higher than conventional cotton 1 028.89% in seeding stage and Xinqiu No.4 was significantly higher than conventional cotton 793.18% in flowering and boll stage. (2) The content of nitrate nitrogen reached the maximum in seeding stage, minimum in boll-opening stage, and transgenic *Bt* cottons were significantly different from their conventional cottons in many stages. The content of ammonium nitrogen reached the maximum in seeding stage, minimum in boll-opening stage. The four varieties of transgenic cottons were significantly different from their conventional cot-

tons in squaring stage, flowering and boll stage. The contents of available phosphorus reached the minimum in seeding stage, maximum in boll-opening stage. Lumian No.28 was significantly higher than conventional cotton 10.29% in squaring stage, and Lumian No.36 was significantly higher than conventional cotton 6.77% at seeding stage. Results showed that planting and growth period of transgenic *Bt* cotton were the main factors affecting the residue of *Bt* protein and the content of available nutrients in the rhizosphere.

Keywords: transgenic *Bt* cotton; rhizosphere soil; *Bt* protein; available nutrients content

棉花不仅是我国种植面积最大的转基因作物,更是全球性的主要经济作物和纤维作物,自其广泛种植以来,为社会带来了巨大的经济效益^[1],但与此同时,其对生态环境的潜在安全风险也越来越多地受到全球关注^[2-3]。目前,国内外对转基因抗虫棉环境安全评价的研究主要集中在基因漂移、对土壤微生物数量种类和结构的影响、对非靶标动物的影响、对土壤理化性质的影响等方面。Chen 等^[4]的研究发现,无论是 *Bt* 棉种植还是残基掺入,均对土壤微生物有显著抑制作用。沈法富等^[5]在基因漂移方面进行了较为深入的研究:陆地棉在距离<6 m 时,基因漂移发生的频率较高,但随着种间距离的增加,发生基因漂移的频率呈现逐渐降低的趋势,且当种间距离达到 36 m 时,基因漂移发生的概率几乎为 0;海岛棉在种间距离需达到 72 m 才可避免基因漂移的发生。Wilson 等^[6]通过田间调查发现,转基因抗虫棉会因为对鳞翅目害虫的显著影响而对甘薯白粉虱产生间接影响,造成其种群的增长。

土壤生态系统是转基因作物外源基因及其产物表达的重要场所,在作物生长过程中,根系分泌是 *Bt* 蛋白进入土壤的重要方式,土壤生态系统中特定生物功能类群都有可能因此发生改变。速效养分是植物生长发育过程中必不可少的营养物质,可直接参与土壤的生物化学转化过程^[7],是评价土壤质量的重要指标。本文以转基因抗虫棉为研究对象,重点讨论其对根际土壤 *Bt* 蛋白残留及根际土壤速效养分含量的影响,为转基因抗虫棉的环境安全评价提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 研究区域概况

试验地位于山东省高青县棉花种植示范基地,地理位置为 118°00'N,37°09'E,属于温带性季风气候,年平均气温为 11~14℃,年平均降水量 598.1 mm,平均蒸发量为 1 589.4 mm。全年无霜期 180~200 d,光热资源丰富,年日照时数 2 300~2 900 h。4 个品种转基因抗虫棉及其对照常规棉种植环境一致。

1.2 供试材料

供试棉花为转基因抗虫棉鲁棉研 28 号及其对照常规棉 CK1;鲁棉研 36 号及其对照常规棉 CK2;山农棉 8 号及其对照常规棉 CK3;鑫秋 4 号及其对照常规棉 CK4。试验于 2016 年 5-8 月进行,水肥管理采用常规管理。

1.3 样品采集

试验采用随机区组设计,每个处理 4 个重复。分别在各块棉田棉花生长的苗期、蕾期、花铃期、吐絮期进行土壤样品采集。按五点取样法混合取样,同时避开道路等可能影响因素。采样时去除表面杂草,用“抖根法”取根际土壤,用冰盒保存,带回实验室。一部分土样保存于-80℃,进行土壤 *Bt* 蛋白残留量检测;一部分土样自然风干,过 1.00 mm 筛,进行速效养分含量的检测。

1.4 测定方法

1.4.1 *Bt* 蛋白残留的测定 采用美国 Envirologix 公司的 ELISA 试剂盒,测定棉花根际土壤的 *Bt* 蛋白残留量。

1.4.2 土壤养分含量的测定 土壤养分的测定参照鲍士旦方法进行^[8];硝态氮含量的测定采用紫外分光光度法,铵态氮含量的测定采用靛酚蓝比色法,速效磷含量的测定采用钼锑抗比色法。

1.5 数据统计与分析

采用 SPSS 22.0 软件进行统计分析,采用单因素方差分析(One-way ANOVA)和 LSD 多重比较分析试验数据的差异显著性。

2 结果与分析

2.1 不同生育期转基因抗虫棉根际土壤中 *Bt* 蛋白含量

4 个品种转基因抗虫棉根际土壤 *Bt* 蛋白残留量在各生育期均显著高于对照常规棉($P<0.05$,图 1),且在整个生长期呈现先升高后降低的趋势,蕾期蛋白残留量达到最大。鲁棉研 28 号在苗期、蕾期、花铃期、吐絮期分别显著高于其对照常规棉 427.94%,1029.66%,661.15%,353.98%。鲁棉研 36

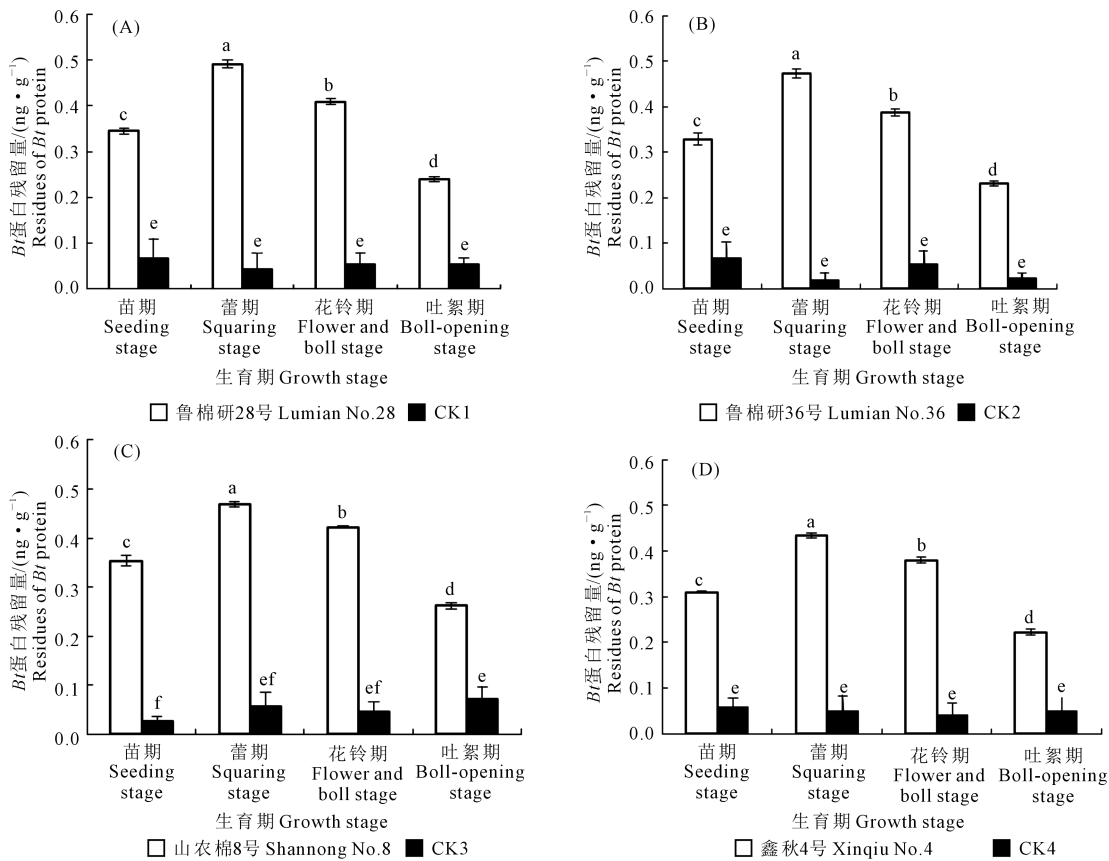
号在苗期、蕾期、花铃期、吐絮期分别显著高于其对照常规棉 393.24%、2573.45%、638.10%、885.53%。山农棉 8 号在苗期、蕾期、花铃期、吐絮期分别显著高于其对照常规棉 1 208.89%、717.94%、836.36%、264.76%。鑫秋 4 号在苗期、蕾期、花铃期、吐絮期分别显著高于其对照常规棉 423.10%、764.74%、793.18%、342.43%。

2.2 转基因抗虫棉根际土壤速效养分含量

2.2.1 转基因抗虫棉根际土壤硝态氮含量 4 个品种转基因抗虫棉及其对照常规棉在整个生长期根际土壤硝态氮含量均表现为苗期最高,吐絮期最低(图 2)。鲁棉研 28 号在苗期低于对照常规棉 18.32%,在蕾期低于对照常规棉 5.98%,在花铃期高于对照常规棉 5.50% ($P<0.05$),在吐絮期与对照常规棉差异不显著 ($P>0.05$);鲁棉研 36 号在苗期显著低于对照常规棉 2.66%,在花铃期显著高于对照常规棉 5.50%,在蕾期、吐絮期与对照常规棉差异不显著;山农棉 8 号在苗期显著低于对照常规棉 16.78%,在蕾期显著低于对照常规棉 10.23%,在花

铃期、吐絮期与对照常规棉差异不显著;鑫秋 4 号及其对照常规棉在苗期、花铃期、吐絮期差异不显著,仅在蕾期显著低于对照常规棉 8.74%。

2.2.2 转基因抗虫棉根际土壤铵态氮含量 4 个品种转基因抗虫棉及对照常规棉整个生长期的根际土壤铵态氮含量均呈下降趋势,表现为苗期含量最高,吐絮期含量最低(图 3)。鲁棉研 28 号在蕾期显著低于对照常规棉 11.51%,在花铃期显著低于对照常规棉 28.22%,在苗期、吐絮期与对照常规棉差异不显著;鲁棉研 36 号在蕾期显著低于对照常规棉 15.22%,在花铃期显著低于对照常规棉 26.52%,在苗期、吐絮期与对照常规棉差异不显著;山农棉 8 号根际土壤铵态氮含量在各生育期均低于对照常规棉,其在蕾期显著低于对照常规棉 12.57%,在花铃期显著低于对照常规棉 25.50%,在苗期、吐絮期与对照常规棉差异不显著;鑫秋 4 号在蕾期、花铃期分别显著低于对照常规棉 3.47%和 21.53%,在吐絮期显著高于对照常规棉 6.22%,在苗期与对照常规棉差异不显著。



注:直方柱上方标不同字母表示差异显著水平 ($P<0.05$),下同。
Note: The different letters above the straight square column indicate significant difference ($P<0.05$), the same below.

图 1 转基因抗虫棉根际土壤 *Bt* 蛋白残留量
Fig.1 Residues of *Bt* protein in rhizosphere soil of transgenic *Bt* cotton

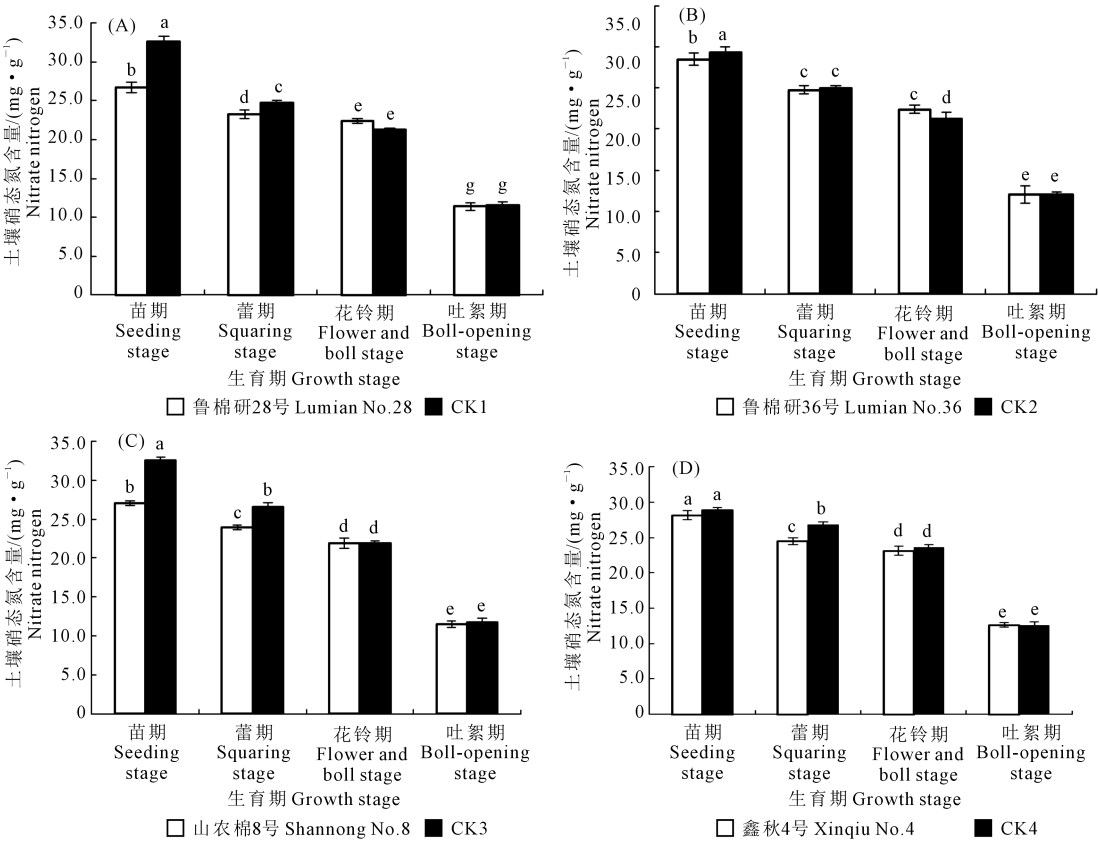


图 2 转基因抗虫棉根际土壤硝态氮含量

Fig.2 The content of nitrate nitrogen in transgenic *Bt* cotton rhizosphere soil

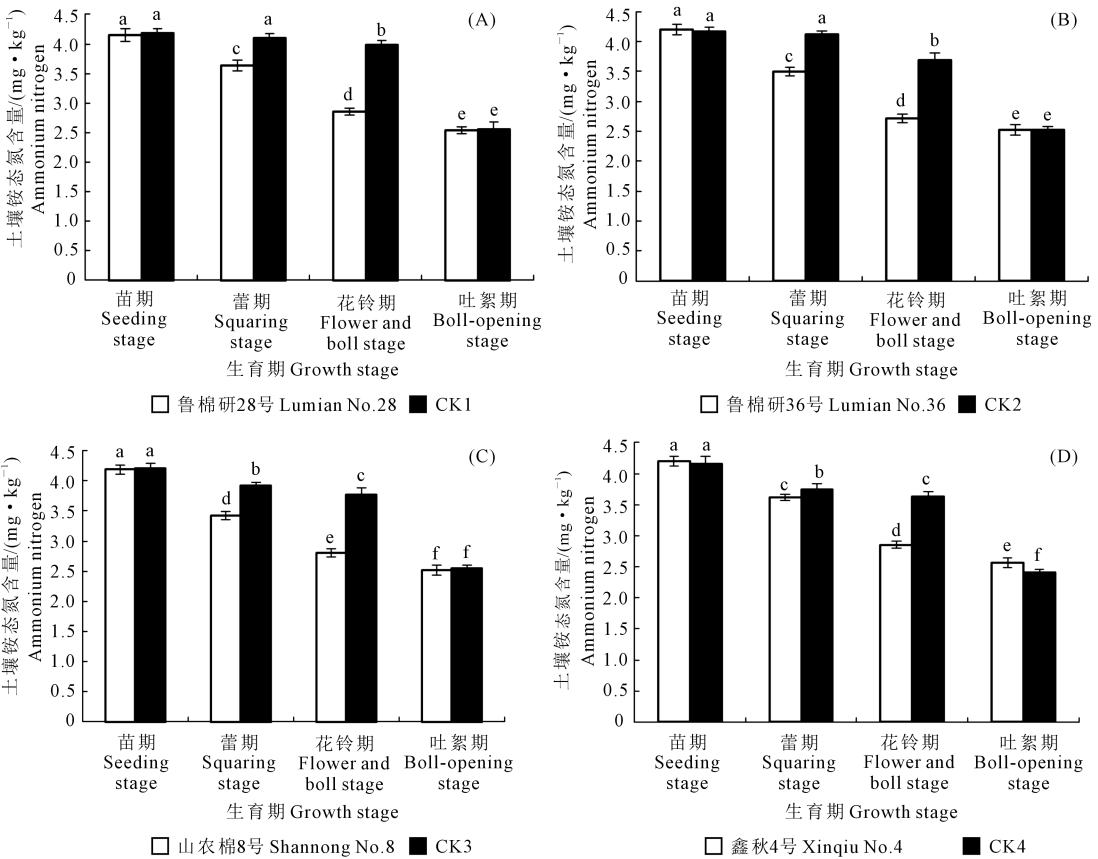


图 3 转基因抗虫棉根际土壤铵态氮含量

Fig.3 The content of ammonium nitrogen in transgenic *Bt* cotton rhizosphere soil

2.2.3 转基因抗虫棉根际土壤速效磷含量 在棉花的整个生长期,4 个品种转基因抗虫棉及其对照常规棉根际土壤速效磷含量均呈上升趋势,表现为苗期含量最低,吐絮期含量最高(图 4)。鲁棉研 28 号根际土壤速效磷含量始终高于对照常规棉,其在蕾期和吐

絮期分别显著高于对照常规棉 10.29%和 8.59%,在苗期、花铃期与对照常规棉差异不显著;鲁棉研 36 号在苗期显著高于对照常规棉 6.77%,在蕾期、花铃期、吐絮期均与对照常规棉差异均不显著;山农棉 8 号、鑫秋 4 号在 4 个生育期均与对照常规棉差异不显著。

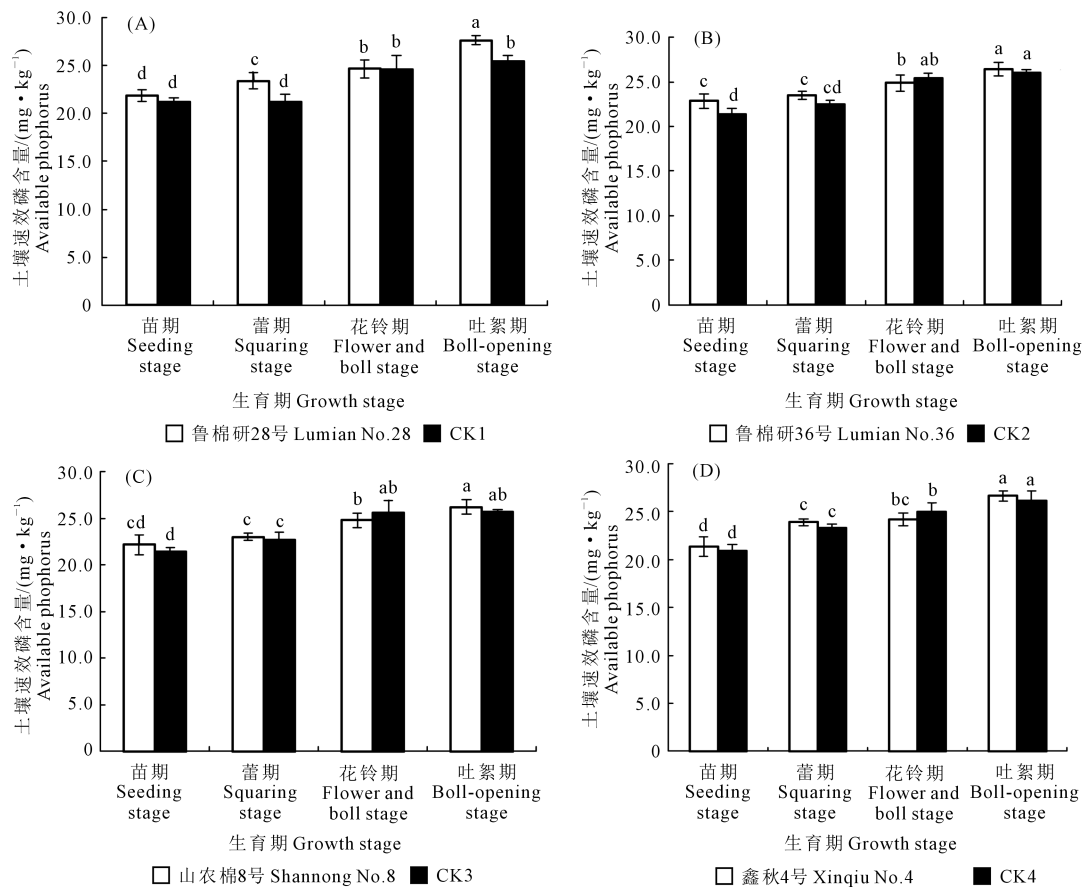


图 4 转基因抗虫棉根际土壤速效磷含量

Fig.4 The content of available phosphorus in transgenic *Bt* cotton rhizosphere soil

3 讨论

研究结果显示,4 个品种转基因抗虫棉根际土壤中 *Bt* 蛋白残留量在整个生长期均呈先升高后降低的趋势,且均显著高于对照常规棉。这与许多专家学者研究结果较为一致^[9-12],但也有研究得出了不同的结果,如张莉等^[13]检测不同地区不同生育期 *Bt*-SY63 稻田土壤 *Bt* 蛋白的残留,大部分都未检测到 *Bt* 蛋白。刘莞莞^[14]检测经 3 种不同方法处理过的转基因抗虫棉土壤,均未检测到 *Bt* 蛋白的残留。造成试验结果差异的原因可能有:试验所用 ELISA 试剂盒不同,其对蛋白的检测限不同,低于检测限的浓度都不能被准确检测;试验选用的棉花品种不同,*Bt* 蛋白的表达规律也不尽相同^[11];试验地不同,土壤微生物组成、土壤水分和环境条件等都可能影响土壤中 *Bt* 蛋白的降解;土壤粒径成分不同,对土壤的

吸附程度不同,进而造成蛋白残留量的不同^[15-16]。随生育期的推进,4 个品种转基因抗虫棉及其对照常规棉根际土壤中硝态氮含量呈下降的趋势,虽因品种不同下降的程度不同,但均为生长后期显著低于生长前期,吐絮期的硝态氮含量最低,这说明生育期是影响棉花根际土壤硝态氮含量的主要因素^[17]。此外,鲁棉研 36 号、鑫秋 4 号硝态氮的含量显著低于同期对照常规棉。这与赵云丽等^[18]的研究结果较为相似。可能是因为外源基因的导入促进根系更多地吸收土壤中的硝态氮^[19],使其在生长前期对硝态氮的吸收和利用率优于亲本。转基因抗虫棉及其对照常规棉根际土壤铵态氮的含量随生育期的推进呈下降趋势。这表明,随生育期的推进,棉花对铵态氮的需求量不断增加^[20]。因棉花品种不同,根际土壤铵态氮含量存在一定差异,4 个品种转基因抗虫棉均表现出与对照常

规棉的显著性差异,这与部分已有研究结果较为相似^[21],根际土壤铵态氮含量可能通过土壤微生物的氨化强度或根系分泌物化学成分变化这两个途径发生改变。但也与许多研究结果存在差异,娜日苏等^[22]研究发现,播种后的 60、90 d,供试 2 种棉花铵态氮含量无显著差异。本试验与其他研究^[23]结论不同可能是因为不同的气候和土壤状况对根系分泌的 *Bt* 外源基因及其表达产物产生了影响,从而影响了这两个途径,使根际土壤铵态氮的含量发生了变化。

在棉花的整个生长期,4 个品种转基因抗虫棉及其对照常规棉根际土壤速效磷含量均呈上升的趋势,这与乌兰图雅等^[21]的研究结果较为一致。试验结果也得出,鲁棉研 28 号、鲁棉研 36 号根际土壤速效磷含量均显著高于对照常规棉,说明转基因抗虫棉可促进磷素向速效态转换^[24],但不同品种转基因棉花对转换的促进程度不同。但也有研究得出了不同的结论,Yang 等^[25]通过盆栽试验得出,转基因棉花的种植可显著降低花铃期根际土壤中速效磷的含量。这与本试验结果存在差异,造成差异的原因可能是不同地区、不同年份土壤状况和气候状况等不同,使种植转基因作物对土壤营养物质转化的影响不同^[21]。

综上所述,生育期和转基因抗虫棉的种植是影响棉花根际 *Bt* 蛋白残留量、速效养分含量的主要因素,棉花品种也会对其产生一定的影响。就目前已有的研究结果来看,转基因抗虫棉种植对土壤生态环境影响存在不同程度的差异,这可能是棉田生态条件、材料选取、施肥管理等各类因素造成的。因此,对于转基因抗虫棉对根际土壤 *Bt* 蛋白残留和速效养分含量影响的研究仍需进行长期的跟踪试验,以期得到更为明确的结论。

参 考 文 献:

[1] 屈西峰,姜玉英,张跃进.我国转基因抗虫棉应用现状和对策[J].中国植保导刊,2001,21(4):37-39.

[2] Sarkar B, Patra A K, Purakayastha T J. Transgenic *Bt*-cotton affects enzyme activity and nutrient availability in a sub-tropical inceptisol[J]. Journal of Agronomy & Crop Science,2008,194(4):289-296.

[3] Shen R F, Cai H, Gong W H. Transgenic *Bt* cotton has no apparent effect on enzymatic activities or functional diversity of microbial communities in rhizosphere soil[J]. Plant and Soil,2006,285(1):149-159.

[4] Chen Z, Wei K, Chen L, et al. Effects of the consecutive cultivation and periodic residue incorporation of *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) cotton on soil microbe-mediated enzymatic properties[J]. Agriculture Ecosystems & Environment,2017,239:154-160.

[5] 沈法富,于元杰,张学坤,等.转基因棉花的 *Bt* 基因流[J].遗传学

报,2001,28(6):562-567.

[6] Wilson D F, Flint H M, Deaton R W, et al. Resistance of cotton lines containing a *Bacillus thuringiensis* toxin to pink bollworm (Lepidoptera: Gelechiidae) and other insects[J]. Journal of Economic Entomology,1992,85(4):1516-1521.

[7] 孙彩霞,张玉兰,缪璐,等.转 *Bt* 基因作物种植对土壤养分含量的影响[J].应用生态学报,2006,17(5):943-946.

[8] 鲍士旦.土壤农化分析.第三版[M].北京:中国农业出版社,2000:54-56,81-85.

[9] 陈慷惋.转基因棉花的 *Bt* 毒素在土壤中的分布及对土壤酶活性的影响[D].武汉:华中农业大学,2008.

[10] 曾萍,冯远娇,张婉纯,等.种植 *Bt* 玉米及秸秆还田后土壤中 *Bt* 蛋白的变化及其对土壤养分的影响[J].应用生态学报,2014,25(7):1997-2003.

[11] 孙彩霞,陈利军,武志杰. *Bt* 杀虫晶体蛋白的土壤残留及其对土壤磷酸酶活性的影响[J].土壤学报,2004,41(5):761-766.

[12] Chen Z H, Chen L J, Wu Z J. Relationships among persistence of *Bacillus thuringiensis* and Cowpea trypsin inhibitor proteins, microbial properties and enzymatic activities in rhizosphere soil after repeated cultivation with transgenic cotton[J]. Applied Soil Ecology,2012,53(2):23-30.

[13] 张莉,胡文军,沈文静,等.多年连续种植转基因 *Bt* 汕优 63 稻田水体和土壤中 Cry1Ab/c 蛋白残留调查[J].生态与农村环境学报,2015,31(4):534-539.

[14] 刘菟菟.转基因抗虫棉 *Bt* 蛋白残留及对土壤生物的影响[D].南京:南京林业大学,2009.

[15] James R R. Utilizing a social ethic toward the environment in assessing genetically engineered insect-resistance in trees[J]. Agriculture and Human Values,1997,14(3):237-249.

[16] Mayeno A N, Gleich G J. Eosinophilia-myalgia syndrome and tryptophan production: a cautionary tale[J]. Trends in Biotechnology,1994,12(9):346-352.

[17] 马丽颖,崔金杰,陈海燕.种植转基因棉对 4 种土壤酶活性的影响[J].棉花学报,2009,21(5):383-387.

[18] 赵云丽,赵建宁,李刚,等.转基因(*Bn*-*csRRM2*)高产棉花对土壤速效养分和酶活性的影响[J].棉花学报,2015,27(2):143-148.

[19] 娜布其,赵建宁,李刚,等.转双价(*Bt*+*CpTI*)棉种植对土壤速效养分和酶活性的影响[J].农业环境科学学报,2011,30(5):930-937.

[20] 张美俊,杨武德,李燕娥.不同生育期转 *Bt* 基因棉种植对根际土壤微生物的影响[J].植物生态学报,2008,32(1):197-203.

[21] 乌兰图雅,李刚,赵建宁,等.不同生育期转双价(*Bt*+*CpTI*)基因抗虫棉根际土壤酶活性和养分含量变化[J].生态学杂志,2012,31(7):1733-1737.

[22] 娜日苏.黄河流域棉区转 *Bt* 基因棉种植对土壤微生物生态学特性的影响[D].呼和浩特:内蒙古师范大学,2011.

[23] 王建武,冯远娇.种植 *Bt* 玉米对土壤微生物活性和肥力的影响[J].生态学报,2005,25(5):1213-1220.

[24] 孙磊,陈兵林,周治国.麦棉套作 *Bt* 棉花根系分泌物对土壤速效养分及微生物的影响[J].棉花学报,2007,19(1):18-22.

[25] Yang W D, Zhang M J, Ding G W. Effect of transgenic *Bt* cotton on bioactivities and nutrients in rhizosphere soil[J]. Communications in Soil Science & Plant Analysis,2012,43(4):689-700.