

DOI: 10.3969/j.issn.2095-1787.2015.03.008

# 种植 *Bt* 水稻后的土壤对赤子爱胜蚓 生长发育及酶活性的影响

刘 凯<sup>1,2</sup>, 杨亚军<sup>1</sup>, 田俊策<sup>1</sup>, 鲁艳辉<sup>1</sup>, 徐红星<sup>1</sup>, 郑许松<sup>1</sup>, 吕仲贤<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>浙江省农业科学院植物保护与微生物研究所, 浙江 杭州 310021;

<sup>2</sup>浙江师范大学化学与生命科学学院, 浙江 金华 321004

**摘要:**【背景】转基因作物种植的安全问题一直备受关注。关于 *Bt* 蛋白对地下非靶标生物影响的研究是转基因作物安全评价的重要内容。【方法】在转 *Bt* 基因水稻收割后的稻田里分别种植豌豆、紫云英和油菜作为后茬作物。分别于 2013 年 1、3 和 6 月 3 次采集不同后茬作物田中的土壤作为材料, 于室内饲养赤子爱胜蚓, 4 周和 7 周后, 测定蚯蚓的生长发育指标、存活率以及体内酶活性的变化情况。此外, 还测定了不同深度土壤中 *Bt* 蛋白的含量以及用 *Bt* 蛋白直接饲喂的赤子爱胜蚓的存活率。【结果】与种植过非转基因水稻 MH63 的土壤相比, 分别种植过含 *cry2A* 和 *cry1C* 基因水稻后的土壤对赤子爱胜蚓的生长发育、存活率及体内酶活性无显著影响。1 月份和 3 月份转 *cry2A* 基因水稻田以及 1 月份转 *cry1C* 基因水稻田采集的表层土样中的 *Bt* 蛋白含量显著高于地下 10 cm 和地下 20 cm 土壤中的含量, 地下 2 层土样中的 *Cry2A* 蛋白含量之间无差异。3 月份转 *cry1C* 基因水稻田以及 6 月份转 *cry2A* 和转 *cry1C* 基因水稻田的土壤中 *Bt* 蛋白的含量均不受土壤深度的影响。种植的后茬作物对土壤中的 *Bt* 蛋白无显著消解作用。室内模拟土壤最高 *Bt* 蛋白浓度的条件下, *Cry2A* 蛋白处理的蚯蚓存活率为 96.7%, *Cry1C* 蛋白处理的蚯蚓存活率为 95.0%, 两者与对照相比无显著差异。【结论与意义】转 *cry2A* 和 *cry1C* 基因 *Bt* 水稻的种植对蚯蚓的生长发育和体内酶活性无显著影响。本研究为转基因水稻的安全评价提供了一定的依据。

**关键词:** 转 *Bt* 基因水稻; 后茬作物; 土壤 *Bt* 蛋白含量; 赤子爱胜蚓; 生长率; 死亡率; 酶活性

## Effect of soil planted with *Bt* rice on the development and enzyme activities of *Eisenia foetida*

kai LIU<sup>1,2</sup>, Ya-jun YANG<sup>1</sup>, Jun-ce TIAN<sup>1</sup>, Yan-hui LU<sup>1</sup>, Hong-xing XU<sup>1</sup>,  
Xu-song ZHENG<sup>1</sup>, Zhong-xian LÜ<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Institute of Plant Protection and Microbiology, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou, Zhejiang 310021, China;

<sup>2</sup>College of Chemistry and Life Science, Zhejiang Normal University, Jinhua, Zhejiang 321004, China

**Abstract:** 【Background】The safety associated with planting transgenic crops remains a concern for the public. Study on the effect of *Bt* proteins on the underground non-target organisms is an important part for the safety evaluation of transgenic crops. 【Method】In this study, pea, alfalfa, and rape were planted as after-reap crops in the experimental field, where transgenic *Bt* rice was previously grown. In the field, soil samples were collected in January, March, and June of 2013 and used to cultivate *Eisenia foetida* in laboratory conditions. At weeks 4 and 7, we determined the development and enzymatic activities of *E.foetida*. The contents of *Bt* protein in soil samples at different depths were determined and the survival rate of *E.foetida* feeding with *Bt* protein directly was evaluated. 【Result】The soil samples collected from the plot planted with transgenic *Bt* rice T1C-19 and T2A-1 had no significant effects on the development, survival rate and enzymatic activities of *E.foetida* compared with soil samples collected from plots planted with the non-transgenic *Bt* rice MH63. Samples of the surface soil showed significantly higher levels of *Cry2A* protein in in January and March and of *Cry1C* protein in January than soil collected in deeper. There were no significant differences in the amounts of *Cry2A* *Bt* protein in 10 cm and 20 cm as well as soils collected from T1C-19 plot in March and June and T2A-1 plot in June. Dynamics of *Bt* protein were not affected by the after-reap crop in this study. The survival rates of *E.foetida* directly fed with *Cry2A* and *Cry1C* proteins were 96.7% and 95.0%, and did not significantly differ from the control. 【Conclusion and significance】Our results indicated that

收稿日期 (Received): 2015-04-19 接受日期 (Accepted): 2015-05-13

基金项目: 国家转基因生物新品种培育重大专项(2014ZX08001-001); 国家水稻产业技术体系(CARS-01-17)

作者简介: 刘凯, 男, 硕士研究生。研究方向: 水稻害虫综合治理。E-mail: liukai5088@126.com

\* 通讯作者 (Author for correspondence), E-mail: luzxmh2004@aliyun.com

the planting of transgenic *cry2A* and *cry1C* *Bt* rice had no significant difference on the development and enzyme activities of *E. foetida*. Our study provides some basic protocol for evaluating the safety of transgenic rice.

**Key words:** transgenic *Bt* rice; afterreap crop; contents of Bt protein in soil samples; *Eisenia foetida*; growth rate; mortality; enzyme activity

全球转基因作物的种植面积已达 1.75 亿  $\text{hm}^2$  (James, 2013), 为降低农田系统中化学农药投入、增加农民收益以及保护自然环境做出了贡献 (Gómez *et al.*, 2008)。转基因作物的种植对非靶标生物的影响一直是人们关注的焦点 (Lundgren *et al.*, 2009; Villiers & Hiisington, 2011)。目前商业化种植的转基因作物中主要的杀虫蛋白基因来源于苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*, *Bt*)。转 *Bt* 基因作物种植过程中产生的 Bt 蛋白能通过根系分泌 (郭永灿等, 1997; 王建武和冯远娇, 2005a; Saxena & Stotzky, 2000; Saxena *et al.*, 1999)、花粉飘落 (Saxena *et al.*, 2002)、残茬分解或秸秆还田 (王建武等, 2005b; 邢珍娟等, 2008) 以及土壤动物活动 (袁一杨和戈峰, 2010) 等方式进入到土壤系统, Bt 蛋白能快速吸附于土壤活性颗粒 (土壤粘土矿物、腐质酸以及有机矿物聚合体等) 的表面, 与之紧密结合以避免被生物降解, 并能保持至少 8 个月甚至 4 年的杀虫活性 (Crecchio & Stotzky, 2001; Icoz & Stotzky, 2008; Tapp & Stotzky, 1995; Vaufleury *et al.*, 2007; Zwahlen *et al.*, 2003)。

土壤中聚集的 Bt 蛋白是否会被后茬作物所吸收, 从而随同食物进入人体, 也是人们关心的问题。而后茬作物的种植是否会加速土壤中 Bt 蛋白的降解还仍未知。

蚯蚓是土壤中常见的杂食性环节动物, 在土壤生态系统中占有重要地位, 对土壤物理性状改良和植物营养循环具有重要作用 (Cortez & Bouche, 2001)。由于蚯蚓直接暴露于土壤的污染物中, 对多种污染物较敏感, 因此常被作为指示生物, 成为土壤污染生态毒理诊断的重要指标, 被广泛应用于土壤生态毒性的研究 (刘廷凤等, 2009)。蚯蚓的存活率和生长发育是 *Bt* 作物对蚯蚓影响研究中的主要生态指标 (张艳艳等, 2012)。目前, 关于 *Bt* 作物对蚯蚓体内酶的影响开展了很多研究, 主要包括过氧化氢酶、超氧化物歧化酶、碱性磷酸酶、谷胱甘肽 S-转移酶、乙酰胆碱酯酶和纤维素酶等 (舒迎花等, 2011; 肖能文等, 2005; Liu *et al.*, 2009)。

本研究在室内条件下, 用种植过 *Bt* 水稻的土

壤饲养赤子爱胜蚓, 观察赤子爱胜蚓的生长发育和存活情况, 同时测定其体内总蛋白的含量、乙酰胆碱酯酶和谷胱甘肽 S-转移酶的活性, 旨在探究转 *Bt* 基因水稻的种植是否会对蚯蚓的生长发育及体内酶的活性产生影响; 并测定了种植不同后茬作物后, 土壤中的 Bt 蛋白含量, 试图探究后茬作物的种植是否会影响土壤中残留 Bt 蛋白的含量; 另外, 在大于土壤中测得的 Bt 蛋白含量的浓度条件下 (Cry2A 蛋白的浓度  $1.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , Cry1C 蛋白浓度  $80 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ), 于室内饲养赤子爱胜蚓, 观察此浓度对蚯蚓存活率的影响, 旨在验证土壤中的 Bt 蛋白是否会影响蚯蚓的存活。这些研究结果可为转 *Bt* 基因水稻的安全评价提供有力的理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

水稻: 转 *Bt* 基因水稻品种 T2A-1 和 T1C-19, 分别表达 *cry2A* 和 *cry1C* 基因; 非转基因对照品种明恢 63 (MH63), 亲本 (籼稻)。3 种水稻种子均由华中农业大学提供。

转基因试验田: 浙江金华石门农场 (N:  $29^{\circ}01'16.7''$ , E:  $119^{\circ}37'17.7''$ , 海拔 106 m), 试验田东西长 71.30 m, 南北宽 26.5 m, 面积 0.19  $\text{hm}^2$ 。试验田平分为 4 大区, 每个大区再分为 9 个小区, 共 36 个小区, 小区之间间隔 0.5 m, 大区之间间隔 1 m (图 1)。每个小区长 11 m, 宽 3.5 m, 面积 38.5  $\text{m}^2$ 。行距 25 cm, 株距 15 cm, 每个小区种 15 行 73 排共 1095 丛水稻。水稻 5 月底育秧, 6 月底移栽, 各个小区均正常水肥管理, 10 月中旬收割后烧毁。11 月初分别种植 3 种后茬作物: 豌豆 *Pisum sativum* L.、油菜 *Brassica campestris* L. 和紫云英 *Astragalus sinicus* L.。

土壤: 供试土壤取自转基因试验田。分别于 2013 年 1 月、3 月和 6 月采集土样。每块稻田分 3 点采集, 按照 20 cm $\times$ 20 cm 的规格采集土壤样品, 装入自封袋中带回实验室用于饲养蚯蚓。以相同标准分别采集土壤表层、地下 10 cm 及 20 cm 深处的土壤, 分别装入自封袋, 带回实验室于 5  $^{\circ}\text{C}$  保存, 待测其中 Bt 蛋白的含量。



图 1 转基因田示意图

Fig.1 Experimental design of this transgenic field study

1: MH63; 2: TIC-19; 3: T2A-1; A: 豌豆 *Pisum sativum*; B: 油菜 *Brassica campestris*; C: 紫云英 *Astragalus sinicus*; D: 空白 Blank.

蚯蚓: 试验所用的赤子爱胜蚓由浙江省农业科学院农药所提供。试验时选择 2 月龄以上、体重 300~600 mg、环带明显、大小一致的健康成蚯蚓, 试验前, 室温下清肠 2 h。

Cry1C 和 Cry2A Bt 蛋白: 购于武汉科诺生物科技股份有限公司。

### 1.2 试验方法

1.2.1 土壤中 Bt 蛋白含量的测定 采用 Envirologix 公司 ELISA Cry1C 和 Cry2A 蛋白定量检测试剂盒检测, 每个处理重复 5 次。根据标准曲线计算 Bt 蛋白的含量, 用每克干土中所含的 Bt 蛋白含量 ( $\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$ ) 表示。

1.2.2 Bt 蛋白对赤子爱胜蚓存活率的影响 根据土壤中测定的 Bt 蛋白 (Cry1C 蛋白和 Cry2A 蛋白) 含量, 设定 Cry1C 蛋白浓度  $80 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  和 Cry2A 蛋白浓度  $1.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。试验采用滤纸法 (王彦华等, 2010), 在直径 9 cm 的培养皿底部垫入直径为 11 cm 的单层滤纸 (滤纸包住培养皿边缘)。将 2 mL 配置好的 Bt 蛋白溶液滴加到滤纸上, 同时设置空白对照组。每个培养皿中加入 6 条已清肠的蚯蚓, 用保鲜膜封口, 并用解剖针在保鲜膜扎孔以保持透气性, 试验于人工气候室 [ $(20 \pm 1) \text{ }^\circ\text{C}$ 、相对湿度 80%~85%] 中进行。每个处理 10 个重复。72 h 后统计蚯蚓的存活数, 以蚯蚓前尾部对机械刺激无反应视为死亡, 并计算存活率。

1.2.3 Bt 水稻种植后的土壤对蚯蚓存活率和死亡率的影响 将田间取回的土壤绞碎均匀后称取 400 g 装入柱状塑料盒 (直径 15 cm, 高 11 cm) 中, 每盒放入 6 条体重 200~300 mg 的蚯蚓。用解剖针扎孔的保鲜膜封口后, 饲养于人工气候室中 (条件同 1.2.2)。每个处理设置 9 个重复。在第 4 周和第 7 周时, 取

出蚯蚓放在室温下清肠 2 h, 用无菌水洗净, 经滤纸干燥后, 称量其总重量, 计算生长率。同时统计死亡率。试验结束后, 将蚯蚓保存在  $-70 \text{ }^\circ\text{C}$  冰箱中, 以供酶源制备。

1.2.4 蚯蚓体内总蛋白含量和解毒酶活性的检测

每个处理选取 3 条健壮、大小一致的蚯蚓, 剪成数段放入预冷的匀浆器中, 按体质量 1:10 加入预冷的 0.9% 生理盐水, 匀浆后  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 $10000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 min, 取上清液于  $-70 \text{ }^\circ\text{C}$  下冷藏, 待测酶活性。

1.2.5 蚯蚓体内酶活性测定 总蛋白含量的测定: 参照考马斯亮蓝法, 以牛血清蛋白做标准曲线, 测定上清液中总蛋白含量。

乙酰胆碱酯酶活性和总蛋白的测定: 采用南京建成科技有限公司的试剂盒进行测定。

谷胱甘肽 S-转移酶活性测定: 在 96 孔酶标板中每孔依次加入  $90 \mu\text{L}$   $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、pH 7.6 的磷酸缓冲液、 $10 \mu\text{L}$  酶液、 $100 \mu\text{L}$   $1.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 CDNB 和  $100 \mu\text{L}$  的  $6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 GSH。用酶标仪每隔 20 s 记录一次  $D_{340 \text{ nm}}$ , 共记录 150 次。酶促反应阶段温度  $27 \text{ }^\circ\text{C}$ 。以反应速度表示酶活力 ( $\Delta D_{340 \text{ nm}} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ )。

### 1.3 数据统计与分析

生长率 =  $(W_t - W_0) / W_0$ ,  $W_0$  为蚯蚓初始重量,  $W_t$  为处理  $t$  天后蚯蚓重量。

死亡率 =  $(D_0 - D_t) / D_0$ ,  $D_0$  为初始蚯蚓数,  $D_t$  为存活蚯蚓数。

采用 SPSS 18.0 软件对试验数据反正弦平方根转换后进行双因素方差分析并采用 Tukey 进行多重比较。采用 Student-Newman-Keuls 检验 ( $P < 0.05$ ) 比较不同处理条件下蚯蚓总蛋白含量和酶活性的差异显著性。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同深度土壤中 Bt 蛋白含量

由表 1 可知,随着取样时间的延长,土壤中 Cry1C 蛋白的含量显著降低( $P<0.01$ )。在相同取样时间和取样深度的条件下,种植 3 种后茬作物的土样中 Cry1C 蛋白的含量与空白对照(抛荒田)相比无显著差异。1 月份采集的土样中,表层土样中的 Cry1C 蛋白含量显著高于地下 10 cm 和地下 20 cm,而地下 2 层中 Cry1C 蛋白的含量差异不显著。3 月份和 6 月份采集的土样中 Cry1C 蛋白的含

量基本不受土壤取样深度的影响,不同深度间 Cry1C 蛋白的含量无显著差异。Cry2A 蛋白含量随着取样时间的延长而显著降低( $P<0.01$ ),相同时间相同深度的条件下,种植 3 种后茬作物的土壤中 Cry2A 蛋白含量与对照(抛荒田)相比无显著差异( $P=0.548$ )。在 1 月和 3 月的土样中,表层土壤中 Cry2A 蛋白含量显著高于地下 10 cm 和地下 20 cm 土壤中 Bt 蛋白含量,地下 10 cm 和地下 20 cm 土壤中 Bt 蛋白含量差异不显著。6 月份采集的土壤中,各土层中 Cry2A 蛋白的含量均无显著差异。

表 1 Bt 水稻田经不同后茬作物种植的土壤中 Bt 蛋白的含量( $\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$ )

Table 1 Amounts of Bt insecticidal proteins in the different soil samples in after-reap Bt rice ( $\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$ )

Bt 水稻 Bt rice	取样时间 Sampling time (month-day)	取样土层深度 Depth of the soil sample (cm)	抛荒田 Fallow	豌豆田 Pea plots	紫云英田 Alfalfa plots	油菜田 Rape plots
T1C-19	01-15	0	0.63±0.02Aa	0.58±0.03Aa	0.70±0.08Aa	0.73±0.08Aa
		10	0.49±0.03Ba	0.48±0.02Ba	0.47±0.04Ba	0.52±0.04ABa
		20	0.40±0.03Ba	0.38±0.02Ca	0.37±0.02Ba	0.43±0.05Ba
	03-15	0	0.42±0.07Aa	0.30±0.03Aa	0.41±0.09Aa	0.38±0.03Aa
		10	0.27±0.03Aa	0.26±0.02Aa	0.29±0.06Aa	0.32±0.02Aa
		20	0.38±0.07Aa	0.28±0.03Aa	0.33±0.01Aa	0.34±0.05Aa
	06-15	0	0.16±0.02Aa	0.16±0.01Aa	0.19±0.02Aa	0.14±0.03Aa
		10	0.16±0.02Aa	0.16±0.02Aa	0.15±0.02Aa	0.18±0.02Aa
		20	0.12±0.02Aa	0.13±0.01Aa	0.15±0.02Aa	0.16±0.02Aa
T2A-1	01-15	0	12.71±0.61Aa	12.85±0.57Aa	11.52±0.49Aa	10.89±0.98Aa
		10	2.22±0.44Ba	2.23±0.30Ba	2.04±0.33Ba	2.17±0.23Ba
		20	1.52±0.10Ba	2.02±0.51Ba	2.07±0.58Ba	1.72±0.16Ba
	03-15	0	7.95±1.36Aa	7.74±1.39Aa	6.43±0.57Aa	5.47±1.13Aa
		10	0.94±0.10Ba	1.08±0.41Ba	0.59±0.06Ba	0.79±0.08Ba
		20	1.11±0.33Ba	0.80±0.06Ba	1.03±0.08Ba	0.72±0.07Ba
	06-15	0	0.37±0.02Aa	0.34±0.04Aa	0.32±0.04Aa	0.35±0.02Aa
		10	0.37±0.03Aa	0.39±0.04Aa	0.32±0.04Aa	0.31±0.05Aa
		20	0.33±0.03Aa	0.35±0.04Aa	0.35±0.02Aa	0.38±0.03Aa

表中数据为平均值±标准误。同列数据后附不同大、小写字母者表示同一时期不同处理在 0.01、0.05 水平上差异显著。

The data in the table represent means±SE. Different small and capital letters in the same column mean significant difference among treatments at the same time at 0.05 and 0.01 levels.

### 2.2 特定 Bt 蛋白浓度对赤子爱胜蚓存活率的影响

根据土壤中 Bt 蛋白的含量设定 Cry2A 蛋白的浓度为  $1.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , Cry1C 蛋白浓度为  $80 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 饲养 72 h 后, Cry2A 处理的蚯蚓存活率为 96.7%, Cry1C 处理的蚯蚓存活率为 95.0%, 空白对照蚯蚓的存活率为 98.3%。结果表明,经过 2 种 Bt 蛋白处理,蚯蚓的存活率与对照相比无显著差异。

### 2.3 不同处理条件下蚯蚓的生长率与死亡率

方差分析结果显示,取样时间、后茬作物、水稻品种、取样时间和后茬作物的交互作用、取样时间

和水稻品种的交互作用、后茬作物和水稻品种的交互作用以及取样时间、后茬作物和水稻品种的交互作用对蚯蚓 4 周和 7 周生长率与死亡率均无显著影响(表 2~4)。

### 2.4 经 Bt 水稻种植后的土壤对蚯蚓体内解毒酶的影响

田间取样试验结果表明,经 Bt 水稻种植后的土壤饲养的蚯蚓,4 周和 7 周后体内的总蛋白含量以及解毒酶 AChE 和 GSTs 活性与对照相比无显著差异(表 5)。

表 2 Bt 水稻田经不同后茬作物种植的土壤饲养的赤子爱胜蚓的生长率 (%)

Table 2 Growth rates (%) of *E.foetida* cultivated under laboratory conditions exposed to the three Bt rice cultivars at weeks 4 and 7

取样时间 Sampling time (month-day)	水稻品种 Cultivar	饲养 4 周 Week 4				饲养 7 周 Week 7			
		抛荒田	豌豆田	紫云英田	油菜田	抛荒田	豌豆田	紫云英田	油菜田
		Fallow	Pea plots	Alfalfaplots	Rape plots	Fallow	Pea plots	Alfalfa plots	Rape plots
01-15	MH63	31.2±3.2a	28.1±4.1a	38.7±4.6a	37.7±3.9a	42.4±4.6a	37.3±6.3a	51.3±6.6a	53.4±6.5a
	T2A-1	26.6±3.6a	31.4±1.6a	32.9±2.7a	29.3±1.8a	34.7±6.1a	40.8±3.5a	41.9±8.5a	39.2±3.0a
	T1C-19	34.9±3.9a	32.1±3.1a	36.9±2.9a	29.6±4.2a	42.6±4.2a	41.9±3.9a	46.8±3.4a	40.7±6.2a
03-15	MH63	33.1±2.8a	33.9±1.7a	40.2±2.4a	33.7±1.2a	46.4±4.6a	48.2±7.3a	50.2±7.9a	43.7±5.3a
	T2A-1	26.4±2.2a	33.1±3.5a	31.6±2.4a	32.6±3.5a	35.8±3.6a	46.9±4.2a	40.5±2.8a	43.6±4.6a
	T1C-19	27.8±2.8a	28.2±2.6a	40.8±3.4a	33.2±2.5a	35.6±1.3a	42.1±4.6a	54.9±5.8a	44.0±6.8a

表中数据为平均值±标准误。同列数据后附不同小写字母者表示同一时期不同处理在 0.05 水平上差异显著。

The data in the table represent means±SE. Different small letters in the same column mean significant difference among treatments at the same time at 0.05 level.

表 3 Bt 水稻田经不同后茬作物种植的土壤饲养的赤子爱胜蚓的死亡率 (%)

Table 3 Mortality rate (%) of *E.foetida* cultivated under laboratory conditions exposed to the three Bt rice cultivars at weeks 4 and 7

取样时间 Sampling time (month-day)	水稻品种 Cultivar	饲养 4 周 Week 4				饲养 7 周 Week 7			
		抛荒田	豌豆田	紫云英田	油菜田	抛荒田	豌豆田	紫云英田	油菜田
		Fallow	Pea plots	Alfalfa plots	Rape plots	Fallow	Pea plots	Alfalfa plots	Rape plots
01-15	MH63	7.4±2.9a	9.3±2.9a	9.3±2.9a	7.4±2.9a	20.4±2.5a	20.4±3.7a	18.5±1.8a	18.5±3.3a
	T2A-1	11.1±2.8a	5.6±2.8a	11.1±2.8a	9.3±4.0a	18.5±3.3a	18.5±4.3a	20.4±3.7a	16.7±3.9a
	T1C-19	9.3±4.0a	9.3±2.9a	9.3±3.7a	12.9±2.5a	24.1±4.0a	20.4±2.5a	22.2±3.9a	20.4±2.5a
03-15	MH63	11.1±2.6a	16.7±2.5a	15.7±2.8a	11.1±2.1a	22.2±2.3a	18.3±2.2a	23.3±1.9a	22.2±2.5a
	T2A-1	9.2±2.9a	15.6±3.6a	10.5±2.2a	10.6±3.0a	15.6±2.1a	21.4±2.3a	16.6±1.4a	17.1±2.6a
	T1C-19	10.1±3.2a	11.1±1.7a	15.6±3.2a	16.7±2.3a	17.2±1.2a	22.2±2.6a	19.6±2.1a	25.8±3.6a

表中数据为平均值±标准误。同列数据后附不同小写字母者表示同一时期不同处理在 0.05 水平上差异显著。

The data in the table represent means±SE. Different small letters in the same column mean significant difference among treatments at the same time at 0.05 level.

表 4 不同处理对蚯蚓生长发育影响的双因素方差分析

Table 4 Three-way ANOVA comparing growth and mortality rates of *E.foetida* under different conditions

因素 Factors	生长率 Growth rate		死亡率 Mortality	
	4 周 Week 4	7 周 Week 7	4 周 Week 4	7 周 Week 7
	取样时间 Sampling dates	0.832	0.573	0.523
后茬作物 After-reap crop	0.097	0.183	0.811	0.995
水稻品种 Rice varieties	0.322	0.097	0.278	0.270
取样时间×后茬作物 Sampling dates× after-reap crop	0.958	0.978	0.464	0.835
取样时间×水稻品种 Sampling dates×rice varieties	0.909	0.787	0.160	0.774
后茬作物×水稻品种 After-reap crop×rice varieties	0.821	0.667	0.357	0.748
取样时间×后茬作物×水稻品种 Sampling time× after-reap crop× rice varieties	0.859	0.826	0.822	0.633

表 5 经 Bt 水稻种植后的土壤对赤子爱胜蚓体内总蛋白含量以及解毒酶活性的影响

Table 5 Activities of detoxification enzymes and contents of protein of *E.foetida* cultivated under laboratory conditions exposed to the three Bt rice at weeks 4 and 7

取样时间 Sampling time (month-day)	水稻品种 Cultivar	总蛋白含量 (mg · g <sup>-1</sup> )		AchE 活性(ΔD <sub>340nm</sub> · min <sup>-1</sup> · mg <sup>-1</sup> )		GSTs 活性(ΔD <sub>340nm</sub> · min <sup>-1</sup> · mg <sup>-1</sup> )	
		4 周	7 周	4 周	7 周	4 周	7 周
		Week 4	Week 7	Week 4	Week 7	Week 4	Week 7
01-15	MH63	39.2±3.6a	41.5±4.9a	7.3±0.6a	7.3±0.4a	1.6±0.3a	1.6±0.1a
	T1C-19	40.6±2.3a	39.9±1.6a	7.2±0.7a	7.1±0.7a	1.5±0.2a	1.7±0.2a
	T2A-1	40.1±4.5a	40.9±4.4a	7.6±0.9a	6.7±0.6a	1.6±0.3a	1.5±0.4a
03-15	MH63	40.6±5.5a	38.2±2.5a	6.5±1.4a	6.6±0.6a	1.7±0.1a	1.5±0.1a
	T1C-19	37.6±3.3a	41.9±2.6a	7.7±0.7a	7.0±1.4a	1.5±0.2a	1.8±0.2a
	T2A-1	41.8±4.5a	42.4±2.1a	6.9±0.6a	7.4±0.9a	1.7±0.2a	1.5±0.3a

表中数据为平均值±标准误。同列数据后附不同小写字母者表示同一时期不同处理在 0.05 水平上差异显著。

The data in the table represent means±SE. Different small letters in the same column mean significant difference among treatments at the same time at 0.05 level.

### 3 讨论

蚯蚓是土壤生物中生物量较大的类群之一,主要以作物残留物为食,在植物残体的降解和土壤中营养物质的循环过程中起重要作用。蚯蚓的挖穴和取食活动能改善土壤和土壤中有机的结构,影响着土壤的疏松性和通气性,并能为土壤中其他生物改善生物资源(Schamphelire *et al.*, 2007)。

Saxena *et al.* (2002)在前茬种植 *Bt* 玉米田中种植非 *Bt* 玉米、胡萝卜和小萝卜等, 20~120 d 后,在后茬作物中没有检测出 *Bt* 蛋白,而土壤中的 *Bt* 蛋白晶体依然存在。在无菌营养液中种植转 *Bt* 基因玉米 15 d 后,再将非 *Bt* 玉米种子移栽到该营养液中, 7~15 d 后,在非 *Bt* 玉米中没有检测到 *Bt* 蛋白。本研究检测了田间不同深度的土样中 *Bt* 蛋白的含量,结果显示无论是转 *cry2A* 基因水稻田还是转 *cry1C* 基因水稻田的土壤中, *Bt* 蛋白的含量均随着时间的延长而降低,其原因可能是随着时间的延长,土壤中的 *Bt* 蛋白逐渐发生降解。3 种后茬作物的种植对土壤各层的 *Bt* 蛋白含量无显著影响,说明测试的 3 种后茬作物对土壤中 *Bt* 蛋白的降解没有显著的作用。1 月份和 3 月份转 *cry2A* 基因水稻田以及 1 月份转 *cry1C* 基因水稻田采集的表层土样中的 *Bt* 蛋白含量显著高于地下 10 cm 和地下 20 cm 土壤中的含量,地下 2 层土样中的 *Cry2A* 蛋白含量之间无显著差异,可能是因为残留水稻秸秆的分解导致表层 *Bt* 蛋白含量高于地下。3 月份转 *cry1C* 基因水稻田以及 6 月份转 *cry2A* 基因水稻田和转 *cry1C* 基因水稻田的土壤中 *Bt* 蛋白的含量均不受土壤深度的影响,原因可能是 *Bt* 蛋白的降解基本完成,含量达到了稳定状态。

有关 *Bt* 作物的种植对蚯蚓生长和繁殖的研究已有很多,Ahl-Goy *et al.* (1995)将 *Bt* 玉米粉碎后加入土壤中饲养蚯蚓,在蚯蚓的肠道和粪便中均能够检测到 *Bt* 蛋白,但 *Bt* 蛋白对蚯蚓没有急性致死效应。Ahmad *et al.* (2006)将 *Bt* 玉米的秸秆粉碎后加入到种植过 *Bt* 玉米的土壤中,发现其对蚯蚓的死亡率和体重变化无显著影响。崔蕾等(2014)发现,转 *cry1Ie* 基因玉米残体对赤子爱胜蚓的体重、产茧量和茧的孵化率没有不利影响。Schrader *et al.* (2008)认为,蚯蚓能够促进 *Bt* 蛋白的降解,但 *Bt* 蛋白对蚯蚓无不良影响。Vercesi *et al.* (2006)的研究表明,在室内设定的转 *cry1Ab* 基因玉米最高 *Bt*

蛋白浓度(5 g · kg<sup>-1</sup>干土)条件下饲喂 *Aporrectodea caliginosa*,对其幼蚓的存活和成蚓的生长和繁殖无显著影响。本研究通过在室内条件下用田间采集的土样饲养蚯蚓 4 周和 7 周,结果表明,无论是饲养 4 周还是 7 周,种植过转 *Bt* 基因水稻后的土壤对蚯蚓的率和死亡率与对照相比无显著差异,在 2 种 *Bt* 蛋白最高浓度的条件下和对照相比对蚯蚓的存活率没有不利影响,表明田间 *Bt* 蛋白的含量不足以对蚯蚓产生影响。

有关 *Bt* 作物对蚯蚓体内酶活性的研究已有较多报道,但大多数研究集中于 *Bt* 玉米和 *Bt* 棉花中(崔蕾等,2014;舒迎花等,2011;肖能文,2005;Liu *et al.*, 2009),均表明其对蚯蚓体内的总蛋白含量、CAT、AChE 和 SOD 酶的活性没有显著影响。而有关转 *Bt* 基因水稻种植对蚯蚓酶活性的研究则较少。本试验测定了用种植过转 *Bt* 基因水稻的土壤处理 4 周和 7 周后的蚯蚓体内的总蛋白含量和 2 种解毒酶 AChE 和 GSTs 活性,结果表明,用种植转 *Bt* 基因水稻过后的土壤饲养赤子爱胜蚓,其体内的总蛋白量以及 AChE 和 GSTs 的活性与对照相比没有显著差异。

综合上述内容,种植过转 *Bt*(*cry2A* 和 *cry1C*)基因水稻的土壤对赤子爱胜蚓的生长发育和繁殖没有不利的影响,对其体内相关的解毒酶以及总蛋白含量亦无显著的影响。*Bt* 蛋白随着时间的延长而逐渐降解,水稻收割初期,土壤表层 *Bt* 蛋白含量显著高于地下土层中的含量。后茬作物的种植对土壤中 *Bt* 蛋白的含量没有影响。*Bt* 蛋白在土壤中存在时间较长,而且会有一定的积累过程,因此需要进一步更长时间的研究来确定其对地下非靶标生物的影响。后茬作物是否存在对 *Bt* 蛋白的吸收亦需要进一步对后茬作物的检测。

**致谢:**感谢浙江省金华市植物保护站陈桂华、张发成和朱平阳对本研究在田间管理和取样过程中的帮助;感谢浙江省农业科学院农产品质量标准研究所王彦华博士提供蚯蚓并技术指导。

### 参考文献

- 崔蕾,白树雄,张天涛,刘允军,何康来,王振营. 2014. 转 *cry1Ie* 基因玉米残体对赤子爱胜蚓的生长发育及体内酶活性的影响, *中国生物防治学报*, 30(4): 466-471.
- 郭永灿,赖勤,颜亨梅,王振中,张友梅,邢协加. 1997. 农

- 药污染对蚯蚓的群落结构与超微结构影响的研究, 中国环境科学, 17(1): 67-71.
- 刘廷凤, 刘振宇, 孙成. 2009. Cu<sup>2+</sup>与草甘膦单一及复合污染对蚯蚓的急性毒性研究, 环境污染与防治, 31(6): 3-6.
- 舒迎花, 马洪辉, 杜艳, 王建武. 2011. Bt 玉米秸秆杀虫蛋白对赤子爱胜蚓酶活性的影响. 应用生态学报, 22(8): 2133-2139.
- 王建武, 冯远娇. 2005a. 种植 Bt 玉米对土壤微生物活性和肥力的影响. 生态学报, 25(5): 1213-1220.
- 王建武, 冯远娇, 骆世明. 2005b. Bt 玉米秸秆分解对土壤酶活性和土壤肥力的影响, 应用生态学报, 16(3): 524-528.
- 王彦华, 陈丽萍, 赵学平, 吴长兴, 苍涛, 俞瑞鲜, 吴声敢, 王强. 2010. 新烟碱类和阿维菌素类药剂对蚯蚓的急性毒性效应. 农业环境科学学报, 29(12): 2299-2304.
- 肖能文, 戈峰, 刘向辉, 2005. Bt 毒蛋白 Cry1Ac 在人造土壤中对赤子爱胜蚓毒理及生化影响. 应用生态学报, 16(8): 1523-1526.
- 邢珍娟, 王振营, 何康来. 2008. 转 Bt 基因玉米幼苗残体中 Cry1Ab 杀虫蛋白田间降解动态. 中国农业科学, 41(2): 412-416.
- 袁一杨, 戈峰. 2010. 转 Bt 基因作物对非靶标土壤动物的影响. 应用生态学报, 21(5): 1339-1345.
- 张艳艳, 舒迎花, 王建武. 2012. 转 Bt 基因作物对蚯蚓影响研究进展. 生态学杂志, 31(9): 2420-2424.
- Ahl-Goy P, Warren G and White J. 1995. Interaction of insect tolerant maize with organisms in the ecosystem. *Mitteilungen des Biologischen Bundesamts für Forstund Landwirtschaft*, 309: 50-53.
- Ahmad A, Wilde G E and Zhu K Y. 2006. Evaluation of effects of coleopteran-specific Cry3Bb1 protein on earthworms exposed to soil containing corn roots or biomass. *Environmental Entomology*, 35: 976-985.
- Cortez J and Bouché M. 2001. Decomposition of mediterranean leaf litters by *Nicodrilus meridionalis* (Lumbricidae) in laboratory and field experiments. *Soil Biology and Biochemistry*, 33: 2023-2035.
- Crecchio C and Stotzky G. 2001. Biodegradation and insecticidal activity of the toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *Kurstaki* bound on complexes of montmorillonite on itehumic acids Alhydroxy-polymers. *Soil Biology and Biochemistry*, 33: 573-581.
- Gómez B M, Berbel J and Rodríguez C E. 2008. Bt corn in Spain the performance of the EU's first GM crop. *Nature Biotechnology*, 26: 384-386.
- Icoz I and Stotzky G. 2008. Fate and effects of insect-resistant Bt crops in soil ecosystems. *Soil Biology and Biochemistry*, 40: 559-586.
- James C. 2013. *Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: ISAAA Brief No. 46*. ISAAA: Ithaca, NY.
- Liu B, Wang L, Zeng Q, Meng J, Hu W J and Li X G. 2009. Assessing effects of transgenic cry1Ac cotton on the earthworm *Eisenia fetida*. *Soil Biology and Biochemistry*, 41: 1841-1846.
- Lundgren J G, Gassmann A J, Bernal J, Duan J J and Ruberson J. 2009. Ecological compatibility of GM crops and biological control. *Crop Protection*, 28: 1017-1030.
- Saxena D and Stotzky G. 2000. Insecticidal toxin from *Bacillus thuringiensis* is released from roots of transgenic Bt corn in vitro and in situ. *FEMS Microbiology Ecology*, 33: 35-39.
- Saxena D, Flores S and Stotzky G. 1999. Insecticidal toxin in root exudates from Bt corn. *Nature*, 402: 480.
- Saxena D, Flores S and Stotzky G. 2002. Bt toxin is released in root exudates from 12 transgenic corn hybrids representing three transformation events. *Soil Biology and Biochemistry*, 34: 132-137.
- Schamphelre M D, Spanoghe P, Brusselman E and Sonck S. 2007. Risk assessment of pesticide spray drift damage in Belgium. *Crop Protection*, 26: 602-611.
- Schrader S, Münchenberg T, Baumgarte S and Tebbe T T. 2008. Earthworms of different functional groups affect the fate of the Bt-toxin Cry1Ab from transgenic maize in soil. *European Journal of Soil Biology*, 44: 283-289.
- Tapp H and Stotzky G. 1995. Insecticidal activity of the toxin from *Bacillus thuringiensis* subspecies *kurstaki* and *tenebrionis* adsorbed and bound on pure and soil clays. *Apply of Environmental Microbiology*, 61: 1786-1790.
- Vaufleury A, Kramarz P E, Binet P, Cortet J, Caul S, Andersen M N, Plumey E, Coeurdassier M and Krogh P H. 2007. Exposure and effects assessments of Bt-maize on non-target organisms (gastropods, microarthropods, mycorrhizal fungi) in microcosms. *Pedobiologia*, 51: 185-194.
- Vercesi M L, Krogh P H and Holmstrup M. 2006. Can *Bacillus thuringiensis* (Bt) corn residues and Bt-corn plants affect life-history traits in the earthworm *Aporrectodea caliginosa*? *Applied Soil Ecology*, 32: 180-187.
- Villiers S M and Hiisington D A. 2011. The trends and future of biotechnology crops for insect pest control. *African Journal of Biotechnology*, 10: 4677.
- Zwahlen C, Hilbeck A, Howald R and Nentwig W. 2003. Effects of transgenic Bt corn litter on the earthworm *Lumbricus terrestris*. *Molecular Ecology*, 12: 1077-1086.