

DOI: 10.3969/j.issn.2095-1787.2017.02.007

转 *Cry1Ac+Cry2Ab* 基因棉花主要生化物质含量变化及其对棉田昆虫的影响

雒珺瑜, 张 帅, 朱香镇, 吕丽敏, 王春义, 崔金杰*
中国农业科学院棉花研究所/棉花生物学国家重点实验室, 河南 安阳 455000

摘要:【目的】新型转基因棉花在进入大规模商业化应用前,需对其生态环境安全性进行评价;同时,经基因改造的新型转基因抗虫棉花可能影响抗虫棉的次生代谢,进而导致一些综合的生态学效应,致使棉花生理上发生改变,这也是转基因植物安全性评价研究的重要内容。【方法】比较了不同关键时期新型转 *Cry1Ac+Cry2Ab* 基因棉花与转 *Cry1Ac* 基因棉花和非转基因棉花叶片的鲜重、干重和干鲜比、主要酶[超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、过氧化物酶(POD)、抗坏血酸过氧化物酶(APX)和谷胱甘肽还原酶(GR)]活性、营养物质(蛋白质、氨态氮、脯氨酸和可溶性糖)和次生代谢产物(棉酚和单宁)含量的差异及其对棉田不同昆虫营养层昆虫个体总数和物种数的影响。【结果】棉花生长的蕾期、花期和花铃期,转 *Cry1Ac+Cry2Ab* 基因棉花、转 *Cry1Ac* 基因棉花和非转基因棉花叶片的鲜重、干重和干鲜比呈先升高后降低的趋势;SOD 和 POD 活性在花铃期明显升高,CAT、APX 和 GR 活性无显著变化;蛋白质、氨态氮含量无明显变化,脯氨酸和可溶性糖含量均表现为先升高后下降的趋势;棉酚含量在 3 个时期无显著变化,而单宁含量呈逐渐升高的趋势。3 种棉花叶片中干物质积累、主要酶活性、营养物质和次生代谢产物含量均无显著差异;单株大铃数表现为转 *Cry1Ac+Cry2Ab* 基因棉花>转 *Cry1Ac* 基因棉花>非转基因棉花,小铃数则表现为转 *Cry1Ac* 基因棉花<*Cry1Ac+Cry2Ab* 基因棉花<非转基因棉花;昆虫群落和害虫亚群落的昆虫个体总数均表现为转 *Cry1Ac+Cry2Ab* 基因棉田<转 *Cry1Ac* 基因棉田<非转基因棉田,天敌亚群落昆虫个体总数无显著变化;3 种棉田中昆虫群落、害虫亚群落和天敌亚群落的物种数均未发生显著变化。【结论】转 *Cry1Ac + Cry2Ab* 基因棉花叶片干物质积累、产量性状、生化物质含量、酶活性在不同生长期表现不同,但上述参数在 3 种棉花之间无显著差异;且转 *Cry1Ac + Cry2Ab* 基因棉花具有较好的抗虫性,能有效降低棉田害虫数量。

关键词: 转 *Cry1Ac+Cry2Ab* 基因棉花; 生化物质含量; 昆虫个体总数; 物种数

Effects of transgenic *Cry1Ac+Cry2Ab* cotton on biochemical substances and insects

LUO Junyu, ZHANG Shuai, ZHU Xiangzhen, LÜ Limin, WANG Chunyi, CUI Jinjie*
State Key Laboratory of Cotton Biology/Institute of Cotton Research, Chinese Academy of Agricultural Sciences,
Anyang, Henan 455000, China

Abstract:【Aim】A very important ecological task before introducing a new type of genetically modified cotton for large-scale commercial applications is to evaluate its biosafety. The secondary metabolism of cotton may be affected by the new gene introduced and even lead to a series of ecological effects. The physiological changes in the cotton cultivar are also an important part of safety evaluation of transgenic plants.【Method】This paper compares the transgenic *Cry1Ac+Cry2Ab* cotton and *Cry1Ac* cotton with non-transgenic cotton in selected parameters during different critical developmental (seedling, budding and flowering and boll forming stages) periods. These parameters include the fresh and dry mass and ratio of dry mass to fresh mass of cotton leaf. Activities of important enzymes like SOD (super oxide dismutase), CAT (catalase), POD (peroxidase), APX (ascorbate peroxidase) and GR (glutathione reductase) were measured. We also measured the amounts of protein, ammonia nitrogen, soluble sugars, and secondary metabolites like gossypol and tannins. The number of individuals and species in different layers were investigated.【Result】During the bud-

收稿日期(Received): 2016-03-15 接受日期(Accepted): 2016-05-02
基金项目: 转基因生物新品种培育重大专项(2016ZX08011-002)
作者简介: 雒珺瑜, 女, 副研究员。研究方向: 棉田害虫综合防治与转基因生物安全
* 通讯作者(Author for correspondence), E-mail: cuijinjie@126.com

ding, flowering and boll forming, the cotton leaf fresh mass, dry mass, their ratio, protein content and soluble sugars all showed first an increasing, then a decreasing trend. Activities of SOD and POD enzyme significantly increased in the boll forming stage, however, the other enzymes, CAT, APX and GR did not change significantly during the three periods. Ammonia nitrogen had no obvious change. Tannin contents gradually increased, while the gossypol content did not change significantly. Accumulation of dry matter, enzyme activities, nutrient content, and the amounts of secondary metabolites had no significant difference between the three kinds of cotton leaves. The number of big bolls was highest in *Cry1Ac+Cry2Ab* cotton, followed by *Cry1Ac* cotton and non-transgenic cotton; the number of small bolls was lowest in *Cry1Ac* cotton, followed by *Cry1Ac+Cry2Ab*, then non-transgenic cotton. The total number of insect individuals in the insect community and pest sub-community showed that *Cry1Ac+Cry2Ab* cotton < *Cry1Ac* cotton < non-transgenic cotton fields. However, the total number of individuals in the natural enemy sub-community was not significantly different. The number of species in the pest and natural enemy sub-communities between the three kinds of cotton varieties had no obvious difference. 【Conclusion】 Accumulation of dry matter, yield, the amount of biochemical substances and enzyme activities in the transgenic *Cry1Ac+Cry2Ab* cotton showed differences in the three different development stages. The same parameters between the transgenic and non-transgenic cotton had no obvious differences. We registered no difference in the abundance of the censused arthropod community.

Key words: transgenic *Cry1Ac+Cry2Ab* cotton; biochemical substance content; total number of insect individuals; species number

转 *Bt* 基因抗虫棉是目前应用面积最大、使用时间最长的转基因植物 (Romeis *et al.*, 2008), 其有效控制了棉铃虫 *Helicoverpa armigera* Hübner、红铃虫 *Pectinophora gossypiella* (Saunders) 等鳞翅目主要害虫的暴发和危害, 降低了棉田化学农药的使用量和使用次数, 保护和增多了农田自然天敌昆虫的种类和数量, 进而有效地保护了生态环境 (马惠等, 2009; 苏宏华等, 2010; James, 2009; Wu & Guo, 2005)。但任何一种植物在生长发育过程中都会遭受多种害虫危害, 一种抗虫基因不能抵御所有害虫, 且基因的类型不同, 其抗虫效果和靶标害虫也不相同。美洲棉铃虫、红铃虫已在田间对 *Bt* 棉产生了抗性 (Ali *et al.*, 2006; Tabashnik *et al.*, 2010), 且棉铃虫对 *Bt* 棉抗性上升的风险在逐年加大 (梁革梅等, 2000; 徐广等, 2002; Lubna, 2014)。因此, 很多抗性治理和延缓策略应运而生, 其中, 转 2 个或 2 个以上基因被认为是一种比较有效的延缓措施, 不仅可进一步加强转基因植物的抗虫能力, 拓宽其抗虫谱, 而且有助于延缓害虫产生耐受性, 从而延长转基因棉花的使用寿命 (McGaughey *et al.* & Whalon, 1992; Tabashnik *et al.*, 1997)。

棉花等植物在进化过程中, 形成了一套有利于自身发育的基因体系和生理代谢途径, 当外源 *Bt* 基因被导入其内部后, 其自身固有的连锁群被打破, 可能会对其各种性状及生理代谢特性和路径等产生影响, 从而进一步影响植物与有害生物之间的相互关系 (汤德良等, 1996; 王朝生等, 1987; 王琛

柱等, 1993)。因此, 在进行新型转基因棉花生态环境安全评价的同时, 棉花生理代谢方面的改变也成为其安全性评价研究的重要内容。

本文以新型转 *Cry1Ac+Cry2Ab* 棉花为实验材料, 以转 *Cry1Ac* 基因棉花和非转基因棉花为对照, 系统研究棉花叶片干物质积累、产量性状、生化物质含量、酶活性等的差异及其对棉田节肢动物个体数量和物种数的影响, 为新型转双价抗虫基因棉花环境安全评价提供数据支撑。

1 材料与方法

1.1 实验材料

转 *Cry1Ac+Cry2Ab* 基因棉花 (639020), 由中国农业科学院棉花研究所生物技术研究室提供; 转 *Cry1Ac* 基因棉花 (中棉所 41) 和非转基因棉花 (中棉所 49), 均由中国农业科学院棉花研究所遗传育种研究室提供。

1.2 实验方法

实验在中国农业科学院棉花研究所实验农场进行, 棉花播种时间为 2015 年 4 月 30 日。转 *Cry1Ac+Cry2Ab* 基因棉花、转 *Cry1Ac* 基因棉花和非转基因棉花各种 3 个小区, 小区面积 150 m², 小区间随机排列。棉花生长过程中不喷施化学农药, 田间其他管理措施按常规方法操作。

1.2.1 棉花叶片干物质积累及单株铃数 (1) 棉花叶片干物质积累: 分别在棉花生长的蕾期 (6 月 20 日)、花期 (7 月 20 日) 和花铃期 (8 月 20 日) 采集棉

花顶部第 1 片完全展开叶,每个小区随机采集 5 片叶,称其鲜重,然后将叶片置于 108 ℃ 杀青 0.5 h,再置于 80 ℃ 烘 12 h 后,称叶片干重,计算叶片干鲜比。

(2) 单株铃数调查:于 9 月中旬调查棉花单株大铃(直径 ≥ 2 cm)数和小铃(直径 < 2 cm)数,每个小区随机选取 3 个点,每点顺行连续调查 10 株棉花。

1.2.2 生化物质含量测定 (1) 粗酶液的提取。参照 Grace & Logan (1996) 的方法,稍做修改。称取样品 0.3000 g,液氮研磨后,加入 3 mL 提取缓冲液[0.1 mol $\cdot$ L $^{-1}$ K₂HPO₄-KH₂PO₄(pH=7.6)、1 mol $\cdot$ L $^{-1}$ EDTA、0.3% Triton X-100、2% PVP]及少许石英砂于冰浴中研磨匀浆,18000 g、4 ℃ 离心 15 min,取上清液并分装保存于-80 ℃ 超低温冰箱,用于可溶性蛋白含量及抗氧化酶活性的测定。

(2) 超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性测定。采用氮蓝四唑(p-Nitro-Blue tetrazolium chloride, NBT)比色法(李合生, 2000),稍做修改。3 mL 反应体系:1.8 mL 50 mmol $\cdot$ L $^{-1}$ KH₂PO₄-K₂HPO₄(pH=7.6)缓冲液,0.3 mL 130 mmol $\cdot$ L $^{-1}$ 甲硫氨酸(Met),0.3 mL 750 μ mol $\cdot$ L $^{-1}$ NBT,0.3 mL 100 μ mol $\cdot$ L $^{-1}$ EDTA,0.3 mL 20 μ mol $\cdot$ L $^{-1}$ 核黄素。对照管加入 0.005 mL 50 mmol $\cdot$ L $^{-1}$ KH₂PO₄-K₂HPO₄(pH=7.6)缓冲液,样品管加入 0.005 mL 酶液。对照管取 2 支,其中一支置于暗处,其余的试管置于 4000 lx 光下照射 20 min,反应结束后,以不照光的对照管为空白,分别测定其他各管在 560 nm 下的吸光度。以抑制 NBT 光还原的 50%为一个酶活力单位。

(3) 过氧化氢酶(catalase, CAT)活性测定。参照 Knörzer *et al.* (1996) 的方法。利用 H₂O₂ ($\varepsilon = 39.4$ mmol $\cdot$ L $^{-1}$ $\cdot$ cm $^{-1}$) 在 240 nm 的下降速率来测定 CAT 的活性。1 mL 反应体系:10 mmol $\cdot$ L $^{-1}$ KH₂PO₄-K₂HPO₄(pH=7.6)缓冲液,10 mmol $\cdot$ L $^{-1}$ H₂O₂,10 μ L 酶液。利用酶液启动反应,每隔 10 s 记录一次,测定 1 min 内 240 nm 下吸光度的下降值。

(4) 过氧化物酶(oxidase, POD)活性测定。参照 Maehly & Chance (1954) 的方法。愈创木酚在 POD 的催化下氧化成茶褐色产物,此产物在 470 nm 处有最大光吸收($\varepsilon = 26.6$ mmol $\cdot$ L $^{-1}$ $\cdot$ cm $^{-1}$),利用络合物在 470 nm 的增加速率来测定 POD 的活性。1 mL 反应体系:50 mmol $\cdot$ L $^{-1}$ KH₂PO₄-K₂HPO₄ 缓冲液(pH 7.6),0.1 mmol $\cdot$ L $^{-1}$ EDTA,10 mmol $\cdot$ L $^{-1}$

愈创木酚,5 mmol $\cdot$ L $^{-1}$ H₂O₂,5 μ L 酶液。用酶液启动反应,每隔 10 s 记录一次,测定 1 min 内 470 nm 下吸光度的增加速率。

(5) 抗坏血酸过氧化物酶(ascorbate peroxidase, APX)活性测定。参照 Nakano & Asada (1981) 的方法。利用 ASA ($\varepsilon = 2.8$ mmol $\cdot$ L $^{-1}$ $\cdot$ cm $^{-1}$) 在 290 nm 的下降速率来测定 APX 的活性。1 mL 反应体系:50 mmol $\cdot$ L $^{-1}$ KH₂PO₄-K₂HPO₄(pH=7.0)缓冲液,0.1 mmol $\cdot$ L $^{-1}$ EDTA,1 mmol $\cdot$ L $^{-1}$ ASA,2.5 mmol $\cdot$ L $^{-1}$ H₂O₂,10 μ L 酶液。利用酶液启动反应,每隔 10 s 记录一次,测定 0.5 min 内 290 nm 下吸光度的下降值。

(6) 谷胱甘肽还原酶(glutathione reductase, GR)活性测定。参照 Sun *et al.* (2009) 的方法。GR 催化 GSSG 与 NADPH 反应生成 GSH 与 NADP⁺,NADPH 在 334 nm 处有最大光吸收($\varepsilon = 6.2$ mmol $\cdot$ L $^{-1}$ $\cdot$ cm $^{-1}$),利用 NADPH 在 334 nm 的下降速率来测定 GR 的活性。1 mL 反应体系:50 mmol $\cdot$ L $^{-1}$ KH₂PO₄-K₂HPO₄ 缓冲液(2 mmol $\cdot$ L $^{-1}$ EDTA, pH=7.8),2.5 mmol $\cdot$ L $^{-1}$ GSSG,0.2 mmol $\cdot$ L $^{-1}$ NADPH,20 μ L 酶液。用 NADPH 启动反应,每隔 10 s 记录一次,测定 2 min 内 334 nm 下吸光度的减小速率。

(7) 可溶性蛋白含量测定。利用考马斯亮蓝 G-250 染色法进行测定。20 μ L 酶液+980 μ L 水中加入 3 mL 考马斯亮蓝 G-250 染色液,振荡混匀,室温放置 5 min 后读取 595 nm 处的吸光度。利用牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)制作标准曲线。

(8) 脯氨酸含量测定。参照李合生(2000)的方法。称取样品 0.3000 g,加入 3% 磺基水杨酸 3 mL 研磨成匀浆,转移至试管中,沸水浴 10 min,冷却后转移至 10 mL 离心管中,3000 r $\cdot$ min $^{-1}$ 离心 10 min。取上清液 2 mL,置于 10 mL 带塞试管中,加入 1 mL 冰乙酸和 1 mL 酸性茚三酮,沸水浴 30 min,冷却后,加入 2 mL 甲苯,摇匀振荡 30 s,静置片刻,取上层红色甲苯液相于比色杯中,在 520 nm 处测定吸光度。利用脯氨酸制作标准曲线。

(9) 可溶性糖含量测定。参照李合生(2000)的方法。称取样品 0.1000 g,加入 3 mL 蒸馏水,转移至试管中,沸水浴 30 min(2 次)。冷却后,12000 g 离心 5 min。取上清液 100 μ L,置于 10 mL 试管中,依次加入 0.4 mL 蒸馏水、3 mL 0.2% 蒽酮—浓硫酸,

充分振荡,沸水浴 1 min,冷却至室温后,在 630 nm 处测定吸光度。利用蔗糖制作标准曲线。

(10)总氨基酸含量测定。参照李合生(2000)的方法。称取样品 0.3000 g,在液氮中研磨成粉末,加入 3 mL 10%乙酸,超声提取 30 min(中间摇匀 2 次),12000 g 离心 5 min。取植物样品上清液 100 μ L +400 μ L 无氨蒸馏水,依次加入 750 μ L 水合茚三酮、250 μ L 0.1%抗坏血酸,置于沸水浴中加热 15 min,取出后用冷水迅速冷却并不时摇动,利用 60%乙醇定容到 8 mL,在 570 nm 处测定吸光度。利用亮氨酸制作标准曲线。

(11)棉酚含量测定。棉酚的提取和测定均参照国家标准法(国家标准化管理委员会,1991)。

(12)单宁含量测定。参照 Howell *et al.*(1976)的方法。取棉苗组织约 0.5 g,加 95%乙醇匀浆,4000 g 离心 10 min,将残渣用丙酮洗涤 3 次,离心后的沉淀物风干。准确称取 0.0100 g 风干沉淀物,加 12 mL 正丁醇:HCl 液($V:V=95:5$),混匀后 90 $^{\circ}$ C 水浴 1 h,4000 g 离心 5 min,测上清液的 $D_{550\text{ nm}}$ 。以 $D_{550\text{ nm}}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{mL}^{-1}$ 表示单宁含量。

1.2.3 昆虫结构调查 采用对角线 5 点取样方法(中华人民共和国农业部,2007),从 5 月上旬至 9 月中旬,每 5 d 调查一次 3 种棉田,每点调查 10 株棉花,详细记录取样范围内地面和植株上昆虫的种类和数量,以及所有直接观察到的节肢动物的名称、发育阶段和数量。

1.3 数据统计方法

利用 Excel 软件对数据进行基本处理和筛选,并分析研究区调查结果;运用 SPSS 17.0 软件对所有数据进行统计分析;采用单因素 *t* 检验方差分析和 Duncan's 差异显著性分析,检验不同棉田棉花生化物质含量和昆虫结构等的差异。

2 结果与分析

2.1 叶片干物质积累及单株铃数

棉花生长的蕾期、花期和花铃期,转 *Cry1Ac*+*Cry2Ab* 基因棉花、转 *Cry1Ac* 基因棉花和非转基因棉花叶片的鲜重、干重和干鲜比呈先升高后降低的趋势,均在花期呈现最大值;3 种类型棉花叶片的鲜重、干重和干鲜比无显著差异(表 1)。

单株大铃数表现为转 *Cry1Ac*+*Cry2Ab* 基因棉花

>转 *Cry1Ac* 基因棉花>非转基因棉花,小铃数表现为转 *Cry1Ac* 基因棉花<*Cry1Ac*+*Cry2Ab* 基因棉花<非转基因棉花(表 1)。与非转基因棉花相比,转 *Cry1Ac*+*Cry2Ab* 基因棉花和转 *Cry1Ac* 基因棉花单株大铃数分别增加 60.02%和 46.97%,小铃数分别减少 41.98%和 59.04%,差异均达显著水平。

2.2 叶片酶活性和主要生化物质含量变化

2.2.1 酶活性 3 种棉花叶片中 SOD 和 POD 活性在蕾期和花期没有显著差异,但在花铃期明显升高;CAT、APX 和 GR 活性在 3 个生长阶段没有显著变化。3 种棉花叶片中 SOD、CAT、POD(6 月份除外)、APX 和 GR 活性均无显著差异(表 2)。这表明外源基因的导入,未引起棉花叶片中主要酶活性变化。

2.2.2 营养物质含量 棉花生长的蕾期、花期和花铃期,3 种棉花叶片中蛋白质、氨态氮含量没有明显变化,但脯氨酸和可溶性糖含量均表现为蕾期较低,花期升高,花铃期又下降的趋势;3 种棉花叶片的蛋白质、氨态氮、脯氨酸(8 月份除外)和可溶性糖含量均无显著差异(表 3)。这表明外源基因导入后,棉花叶片中昆虫的营养物质含量未发生显著的变化。

2.2.3 次生代谢物质含量 3 种棉花叶片中的棉酚含量在 3 个生长时期无显著变化,而单宁含量呈逐渐升高的趋势;3 种棉花叶片中棉酚和单宁含量均无显著差异(表 4)。这表明外源基因导入未引起棉花次生代谢物质的显著变化。

2.3 棉田昆虫个体总数与物种数

整个棉花生长发育时期,3 种棉田中昆虫群落和害虫亚群落的昆虫个体总数均表现为转 *Cry1Ac*+*Cry2Ab* 基因棉田<转 *Cry1Ac* 基因棉田<非转基因棉田,且与非转基因棉田相比,转 *Cry1Ac*+*Cry2Ab* 基因棉田昆虫群落和害虫亚群落的昆虫个体总数分别减少 41.85%和 33.02%,转 *Cry1Ac* 基因棉田昆虫群落和害虫亚群落的昆虫个体总数分别减少 42.95%和 34.19%,差异均达显著水平;天敌亚群落的昆虫个体总数无显著变化。3 种棉田昆虫群落、害虫亚群落和天敌亚群落的昆虫物种数均未发生显著变化(表 5)。这表明转基因抗虫棉对棉田靶标害虫具有较强的抗性作用,天敌亚群落昆虫无显著变化。

表 1 不同时期 3 种棉花叶片干物质积累与单株铃数
Table 1 The dry matter accumulation and yield per plant of three kinds of cotton leaves in different stages

品种 Varieties	6 月 20 日 20 June			7 月 20 日 20 July			8 月 20 日 20 August			单株铃数 Bell number per plant	
	鲜重 Fresh mass/g	干重 Dry mass/g	干鲜比 Dry/fresh ratio	鲜重 Fresh mass/g	干重 Dry mass/g	干鲜比 Dry/fresh ratio	鲜重 Fresh mass/g	干重 Dry mass/g	干鲜比 Dry/fresh ratio	大铃数/个 Large boll number	小铃数/个 Young boll number
639020	4.14±0.15	0.54±0.07	0.13±0.01	5.14±0.15	1.53±0.06	0.30±0.01	3.30±0.01	0.84±0.03	0.25±0.01	17.17±0.90*	1.70±0.36*
中棉所 41 CCRI 41	3.98±0.37	0.55±0.06	0.14±0.01	4.98±0.37	1.53±0.10	0.31±0.01	2.98±0.62	0.77±0.19	0.26±0.01	15.77±0.80*	1.20±0.30*
中棉所 49 CCRI 49	3.73±0.20	0.53±0.02	0.14±0.00	4.76±0.38	1.51±0.06	0.32±0.03	3.06±0.48	0.82±0.15	0.27±0.01	10.73±0.51	2.93±0.32

数据为平均值±SD。* 代表不同品种间差异显著 ($P<0.05$)。
Values are means±SD. * indicate significant differences among different varieties ($P<0.05$).

表 2 不同时期 3 种棉花叶片 SOD、CAT、POD、APX、GR 活性
Table 2 The activities of SOD, CAT, POD, APX, GR of three kinds of cotton leaves in different stages

品种 Varieties	6 月 20 日 20 June					7 月 20 日 20 July					8 月 20 日 20 August				
	SOD 活性 SOD activity $/(U \cdot g^{-1})$	POD 活性 POD activity $/(μmol \cdot min^{-1})$	APX 活性 APX activity $/(μmol \cdot min^{-1})$	GR 活性 GR activity $/(mmol \cdot min^{-1})$	GR 活性 GR activity $/(mmol \cdot min^{-1})$	SOD 活性 SOD activity $/(U \cdot g^{-1})$	CAT 活性 CAT activity $/(μmol \cdot min^{-1})$	POD 活性 POD activity $/(μmol \cdot min^{-1})$	APX 活性 APX activity $/(μmol \cdot min^{-1})$	GR 活性 GR activity $/(mmol \cdot min^{-1})$	SOD 活性 SOD activity $/(U \cdot g^{-1})$	CAT 活性 CAT activity $/(μmol \cdot min^{-1})$	POD 活性 POD activity $/(μmol \cdot min^{-1})$	APX 活性 APX activity $/(μmol \cdot min^{-1})$	GR 活性 GR activity $/(mmol \cdot min^{-1})$
639020	152.48±9.22	0.12±0.03	0.83±0.07*	0.33±0.03	11.98±4.70	149.78±7.93	0.10±0.02	1.67±0.02	0.37±0.10	8.82±0.78	179.60±18.63	0.14±0.01	2.26±0.27	0.33±0.05	18.15±7.37
中棉所 41 CCRI 41	160.55±20.57	0.15±0.03	1.18±0.09	0.44±0.02	11.14±2.48	127.29±2.62	0.10±0.04	1.65±0.26	0.33±0.05	8.09±4.68	187.70±10.52	0.17±0.01	2.42±0.46	0.33±0.03	10.79±3.40
中棉所 49 CCRI 49	147.12±21.53	0.14±0.01	1.37±0.09	0.38±0.04	11.91±4.01	149.98±16.19	0.09±0.02	2.20±0.68	0.44±0.10	9.20±5.68	198.68±25.30	0.15±0.01	2.22±0.07	0.38±0.01	16.18±5.36

数据为平均值±SD。* 代表不同品种间差异显著 ($P<0.05$)。
Values are means±SD. * indicate significant differences among different varieties ($P<0.05$).

表 3 不同时期 3 种棉花叶片的营养物质含量
Table 3 The contents of main nutrients of three kinds of cotton leaves in different stages

品种 Varieties	6 月 20 日 20 June					7 月 20 日 20 July					8 月 20 日 20 August				
	蛋白质含量 Protein content $/(mg \cdot g^{-1})$	脯氨酸含量 Proline content $/(μg \cdot g^{-1})$	可溶性糖含量 Soluble sugar content $/(mg \cdot g^{-1})$	氨态氮含量 Ammonia nitrogen content $/(g \cdot kg^{-1})$	氨态氮含量 Ammonia nitrogen content $/(g \cdot kg^{-1})$	蛋白质含量 Protein content $/(mg \cdot g^{-1})$	脯氨酸含量 Proline content $/(μg \cdot g^{-1})$	可溶性糖含量 Soluble sugar content $/(mg \cdot g^{-1})$	脯氨酸含量 Proline content $/(μg \cdot g^{-1})$	可溶性糖含量 Soluble sugar content $/(mg \cdot g^{-1})$	氨态氮含量 Ammonia nitrogen content $/(g \cdot kg^{-1})$	氨态氮含量 Ammonia nitrogen content $/(g \cdot kg^{-1})$	可溶性糖含量 Soluble sugar content $/(mg \cdot g^{-1})$	脯氨酸含量 Proline content $/(μg \cdot g^{-1})$	可溶性糖含量 Soluble sugar content $/(mg \cdot g^{-1})$
639020	31.03±2.21	28.84±5.91	5.09±1.08	0.50±0.10	0.50±0.00	23.56±1.14	54.16±5.67	13.10±0.80	0.50±0.00	28.57±2.33	27.92±1.80*	0.50±0.10	11.97±2.74	32.85±3.92*	11.50±0.93
中棉所 41 CCRI 41	28.52±2.24	25.21±7.60	6.70±1.92	0.30±0.00	0.50±0.10	27.40±2.11	47.82±6.20	15.72±1.86	0.50±0.10	27.34±2.09	32.85±3.92*	0.40±0.10	11.50±0.93	39.79±2.42	11.34±1.54
中棉所 49 CCRI 49	27.65±0.60	27.08±2.84	6.93±0.60	0.40±0.10	0.40±0.10	24.73±1.05	48.11±9.32	15.14±1.11	0.40±0.10	26.61±0.44	39.79±2.42	0.40±0.00	11.34±1.54	39.79±2.42	11.34±1.54

数据为平均值±SD。* 代表不同品种间差异显著 ($P<0.05$)。
Values are means±SD. * indicate significant differences among different varieties ($P<0.05$).

表 4 不同时期 3 种棉花叶片的次生代谢物质含量
Table 4 The contents of main secondary metabolite of three kinds of cotton leaves in different stages

品种 Varieties	6 月 20 日 20 June		7 月 20 日 20 July		8 月 20 日 20 August	
	棉酚含量	单宁含量	棉酚含量	单宁含量	棉酚含量	单宁含量
	Gossypol content /(mg·g ⁻¹)	Tannin content /(D _{50nm} ·g ⁻¹ ·mL ⁻¹)	Gossypol content /(mg·g ⁻¹)	Tannin content /(D _{50nm} ·g ⁻¹ ·mL ⁻¹)	Gossypol content /(mg·g ⁻¹)	Tannin content /(D _{50nm} ·g ⁻¹ ·mL ⁻¹)
639020	1.02±0.11	0.97±0.43	0.79±0.07	3.34±0.20	0.94±0.05	4.67±0.43
中棉所 41 CCRI 41	0.92±0.11	1.33±0.51	0.76±0.08	3.03±0.16	0.92±0.11	4.52±0.38
中棉所 49 CCRI 49	0.80±0.07	1.67±0.65	0.88±0.05	3.38±0.29	0.84±0.11	5.31±0.60

数据为平均值±SD。
Values are means±SD.

表 5 不同时期 3 种棉田昆虫个体总数与物种数
Table 5 The total number of individuals and species number of insects in 3 cotton fields

营养层 Nutrient layer	个体总数/头 The total number of individuals			物种数/种 The species number of insects		
	639020	中棉所 41 CCRI 41	中棉所 49 CCRI 49	639020	中棉所 41 CCRI41	中棉所 49 CCRI 49
昆虫群落 Insect ommunity	144654.67±3766.30	166603.33±9558.43	248743.00±2849.54 *	65.33±5.03	65.67±0.58	66.00±1.00
害虫亚群落 Pest sub-community	134557.67±5919.95	155238.00±8631.69	235877.00±4456.70 *	32.67±2.52	32.00±0.00	32.67±0.58
天敌亚群落 Enemy sub-community	10097.00±2879.83	11365.33±1283.68	12866.00±1507.75	32.67±2.52	33.67±0.58	34.33±1.53

数据为平均值±SD。* 代表不同品种间差异显著 ($P<0.05$)。
Values are means±SD. * indicate significant differences among different varieties ($P<0.05$).

3 讨论

棉花生长发育期干物质生产是连续不间断的过程,每个时期的累积量和特性不同(代英男等, 2015)。棉花干物质与产量主要取决于品种的遗传特性,不同栽培措施和环境生态条件也会对其干物质产生重要的影响(雒珺瑜等, 2015; 左娇, 2013; 张兴华等, 2012)。本研究结果表明,转 *Cry1Ac* + *Cry2Ab* 基因棉花、转 *Cry1Ac* 基因棉花和非转基因棉花叶片的鲜重、干重和干鲜比在棉花不同生长期均不同,但这些指标在 3 种棉花间无显著差异,表明外源双价基因的导入,对其干物质积累没有显著影响。此外,单株大铃数表现为转 *Cry1Ac* + *Cry2Ab* 基因棉花>转 *Cry1Ac* 基因棉花>非转基因棉花,小铃数则表现为转 *Cry1Ac* 基因棉花<*Cry1Ac* + *Cry2Ab* 基因棉花<非转基因棉花。这主要是由于 2 种转基因抗虫棉对棉田害虫具有较好的抗性,减轻了害虫的危害,保持了较好的长势和产量;而非转基因棉花由于遭受害虫严重危害,多形成多头棉,棉花具有较强的补偿能力(王香河, 2003),后期晚熟晚发过程中形成了较多的小铃。

外源基因的导入,可能会对棉花植株内的生化物质及相关酶类产生影响(钦俊德, 1987),从而影响昆虫的取食行为(周明牂, 1992)。本研究发现, SOD、POD、CAT、APX 和 GR 等活性,以及蛋白质、脯氨酸、可溶性糖及氨态氮等含量在棉花不同生长期表现不同,但 3 种棉花之间未见显著差异(除个别时期外)。而白素芬等(2001)对萌发棉花种子的酯酶同工酶酶谱的分析发现,转基因抗虫棉后代的酶带与亲本的酶带存在较大差异,说明外源基因的导入对棉花酯酶同工酶有影响;丁志勇等(2001)也发现,转 *Bt* 基因棉的可溶性过氧化物酶的活性显著高于常规棉,且转 *Bt* 基因棉中酯酶的酶谱和活性与常规棉明显不同。主要原因可能是所用的实验材料不同,且不同环境、不同时期植株体内生理代谢和所产生的生化物质含量不同(田晓莉等, 2000)。

植物与昆虫在长期的进化过程中形成了相互适应和协同进化机制,害虫对寄主植物进行选择适应,而植物为抵抗害虫的侵害也发展了一套抗虫防御体系。转基因抗虫棉对棉田靶标类害虫具有较强的控制作用(路献勇等, 2013, 2014),从而使转 *Cry1Ac*+*Cry2Ab* 基因棉田和转 *Cry1Ac* 基因棉田昆

虫群落和害虫亚群落的昆虫个体总数减少,但未引起物种数的变化(雒珺瑜等,2014)。

在进行生态风险评价时,除了关注转基因植物的外源基因及产物外,基因改造工程可能引起的其他生理改变也是一个重要方面。基因改造和组培过程可能在一定程度上影响原有基因的表达,改变转基因植物的生理特性,尤其是次生物质的代谢,进而影响转基因植物抗病、抗旱等性状,也可能会影响该转基因植物与其他动植物或微生物的关系,进而影响原有生态环境的生态系统结构。因此,该方面的研究尚需进一步系统的跟踪监测。

参考文献

- 白素芬,牛永章,张原根,郭宝德,黄穗兰,王景雪,孙毅, 2001. 外源基因导入对棉花同工酶的影响. 山西农业大学学报, 21(3): 239-240.
- 代英男,马一学,陈金湘,白玉超, 2015. 棉花干物质积累特征及其影响因素. 安徽农业科学, 43(27): 6-7, 10.
- 丁志勇,许崇任,王戎疆, 2001. 转 Bt 基因抗虫棉与常规棉中几种同工酶的比较及转基因植物安全性评价生理指标初探. 生态学报, 21(2): 332-336.
- 国家标准化管理委员会, 1991. 饲料中游离棉酚的测定方法: GB 13086-1991. 北京: 中国标准出版社.
- 李合生, 2000. 植物生理生化实验原理和技术. 北京: 高等教育出版社.
- 李丽莉,王振营,何康来,彭于发, 2004. 转基因抗虫作物对非靶标昆虫的影响. 生态学报, 24(8): 1793-1802.
- 梁梅梅,谭维嘉,郭予元, 2000. 棉铃虫对 Bt 的抗性筛选及交互抗性研究. 中国农业科学, 33(4): 46-53.
- 路献勇,张帅,吕丽敏,雒珺瑜,王春义,崔金杰, 2013. Cry2Ab 蛋白对甜菜夜蛾和斜纹夜蛾低龄幼虫的抗性. 生物安全学报, 22(2): 109-114.
- 路献勇,张帅,吕丽敏,雒珺瑜,王春义,崔金杰, 2014. 不同 Bt 蛋白对棉铃虫存活率和生长发育的影响. 生物安全学报, 23(1): 34-39.
- 雒珺瑜,张帅,吕丽敏,王春义,朱香镇,李春花,崔金杰, 2014. 转 Cry1Ac+Cry2Ab 棉花生长势及其对棉田节肢动物物种丰富度的影响. 生物安全学报, 23(4): 256-264.
- 雒珺瑜,张帅,王春义,吕丽敏,朱香镇,李春花,崔金杰, 2015. 棉田非靶标害虫发生丰度与气象因子的关联性分析. 生物安全学报, 24(3): 232-237.
- 马惠,夏晓明,周玉,赵鸣,王红艳, 2009. 转 Bt 基因抗虫棉对非靶标昆虫的影响. 中国农学通报, 25(7): 214-218.
- 钦俊德, 1987. 昆虫与植物的关系——论昆虫与植物的相互作用及其演化. 北京: 科学出版社.
- 苏宏华,范娜,李达,杨益众, 2010. 转 Bt 基因棉对甜菜夜蛾的影响. 植物保护, 36(5): 1-5.
- 汤德良,王武刚,裴鑫德, 1996. 棉花品种对棉铃虫营养的影响. 中国农业大学学报, 1(3): 47-51.
- 田晓莉,杨培珠, 2000. 转 Bt 基因抗虫棉中棉所 30 的碳、氮代谢特征. 棉花学报, 12(4): 172-175.
- 王朝生,董顺文,辜明芳,陈素彬, 1987. 几组棉花抗虫品系单宁含量分析. 中国棉花 (2): 22-24.
- 王琛柱,张青文,杨奇华,周明群, 1993. 棉酚和可水解丹宁含量与棉花抗棉铃虫的关系. 北京农业大学学报, 19(S): 66-70.
- 王香河, 2003. 棉花留叶枝对产量的超补偿效应研究. 硕士学位论文. 北京: 中国农业科学院棉花研究所.
- 文学,张宝红, 2000. 转基因抗虫棉研究现状与展望. 农业生物技术学报, 8(2): 194-199.
- 徐广,王桂荣,吴孔明,郭予元, 2002. 棉铃虫不同地理种群间基因流动的 RFLP 分析. 棉花学报, 14(6): 352-355.
- 张兴华,田绍仁,张天玉,李捷,乔艳艳, 2012. 转 cry1Ac+cry2Ab 基因棉与转 cry1Ac+EPSPS 基因棉荒地的生存竞争能力. 生物安全学报, 21(2): 119-124.
- 中华人民共和国农业部, 2007. 农业部 953 号公告-12.2-2007 转基因植物及其产品环境安全检测抗虫棉花第 2 部分: 生存竞争能力. (2007-12-18) [2016-02-10]. http://www.moa.gov.cn/zwillm/tzgg/gg/200801/t20080110_952066.htm.
- 周明群, 1992. 作物抗虫性原理及应用. 北京: 北京农业大学出版社.
- 左娇,郭运玲,孔华,黄启星,徐林,周霞,郭安平, 2013. 转基因棉花环境安全性研究进展. 热带农业工程, 37(2): 5-10.
- ALI M L, LUTTRELL R G, YOUNG Y S, 2006. Susceptibilities of *Helicoverpa zea* and *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) populations to Cry1Ac insecticidal protein. *Journal of Economic Entomology*, 99(1): 164-175.
- GRACE S C, LOGAN B A, 1996. Acclimation of foliar antioxidant systems to growth irradiance in three broad-leaved evergreen species. *Plant Physiology*, 112(4): 1631-1640.
- HOWELL C R, BELL A A, STIPANOVIC R D, 1976. Effect of aging on flavonoid content and resistance of cotton leaves to verticillium wilt. *Physiological Plant Pathology*, 8(2): 181-188.
- JAMES C, 2009. *Brief 41 global status of commercialized biotech/GM crops*: 2009. Ithaca, NY: ISAAA.

- KNÖRZER O C, BURNER J, BOGER P, 1996. Alterations in the antioxidative system of suspension-cultured soybean cells (*Glycine max*) induced by oxidative stress. *Physiologia Plantarum*, 97(2): 388–396.
- LUBNA B, 2014. Resistance of different transgenic *Bt* cotton and monitoring the resistant dynamics of *Helicoverpa armigera* (Hübner) to *Bt* toxin. 博士学位论文. 安阳: 中国农业科学院棉花研究所.
- MAEHLY A C, CHANCE B, 1954. The assay of catalase and peroxide//GLICK D. *Methods of biochemical analysis*. New York: Interscience: 357–424.
- MCGAUGHEY W H, WHALON M E, 1992. Man-aging insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. *Science*, 258: 1451–1455.
- NAKANO Y, ASADA K, 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant & Cell Physiology*, 22(5): 867–880.
- ROMEIS J, BARTSCH D, BIGLER F, CANDOLFI M P, GIELKENS M M, HARTLEY S E, HELLMICH R L, HUESING J E, JEPSON P C, LAYTON R, QUEMADA H, RAYBOULD A, ROSE R I, SCHIEMANN J, SEARS M K, SHELTON A M, SWEET J, VAITUZIS Z, WOLT J D, 2008. Assessment of risk of insect-resistant transgenic crops to nontarget arthropods. *Nature Biotechnology*, 26(2): 203–208.
- SUN J, CHEN S L, DAI S X, WANG R, LI N, SHEN X, 2009. NaCl-induced alternations of cellular and tissue ion fluxes in roots of salt-resistant and salt-sensitive poplar species. *Plant Physiology*, 149(2): 1141–1153.
- TABASHNIK B E, LIU Y B, FINSON N, MASSON L, HEEKEL D G, 1997. One gene in diamondback moth confers resistance to four *Bacillus thuringiensis* toxins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(5): 1640–1644.
- TABASHNIK B E, SISTERTON M S, ELLSWORTH P C, DENNEHY T J, ANTILLA L, LIESNER L, WHITLOW M, STATEN R T, FABRICK J A, UNNITHAN G C, 2010. Suppressing resistance to Bt cotton with sterile insect releases. *Nature Biotechnology*, 28(12): 1304–1307.
- WU K M, GUO Y Y, 2005. The evolution of cotton pest management practices in China. *Annual Review of Entomology*, 50(1): 31–52.

(责任编辑:杨郁霞)