

# Bt 转基因水稻米粉对家蚕生长发育及中肠亚显微结构的影响

王忠华<sup>1</sup>, 舒庆尧<sup>1</sup>, 崔海瑞<sup>1</sup>, 徐孟奎<sup>2</sup>, 谢小波<sup>1,3</sup>, 夏英武<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> 浙江大学原子核农业科学研究所; <sup>2</sup> 浙江大学蚕学系, 杭州 310029; <sup>3</sup> 中国水稻研究所, 杭州 310006)

摘要: 以 3 龄家蚕为供食对象, 用洒过转苏云金杆菌(*Bacillus thuringiensis*, Bt) 基因水稻纯合品系 KMD2 生米粉或熟米粉的桑叶喂养, 研究 Bt 抗虫水稻稻米对家蚕生长发育及中肠亚显微结构的影响, 以明确生米粉与熟米粉之间的差异。结果发现, 用前者喂养的家蚕体重、熟蚕数、结茧数、全茧量和茧层量均明显低于后者和对照, 熟蚕整齐度明显迟于后者和对照; 而后者与对照之间无明显差异。进一步的病理切片电镜分析表明, 用前者喂养的家蚕, 其中肠细胞亚显微结构发生了明显的变化, 杯形细胞和圆筒形细胞的微绒毛明显变短、变粗, 线粒体和粗面型内质网的数量显著下降; 而后者与对照之间无显著差异。由此表明, 经蒸煮后 Bt 水稻稻米中的杀虫蛋白发生变性, 失去活性, 进而丧失致毒能力。

关键词: 转苏云金杆菌(*Bacillus thuringiensis*, Bt) 基因水稻; 家蚕; 中肠亚显微结构

## The Effect of Bt Transgenic Rice Flour on the Development of Silkworm Larvae and the Sub-micro-structure of Its Midgut

WANG Zhong-hua<sup>1</sup>, SHU Qing-yao<sup>1</sup>, CUI Hai-rui<sup>1</sup>, XU Meng-kui<sup>2</sup>, XIE Xiao-bo<sup>1,3</sup>, XIA Ying-wu<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> Institute of Nuclear Agricultural Sciences, Zhejiang University;

<sup>2</sup> Department of Sericulture, Zhejiang University, Hangzhou 310029;

<sup>3</sup> China National Rice Research Institute, Hangzhou 310006)

Abstract: This study was conducted on the influence of Bt transgenic rice raw flour containing *cry1 Ab* gene on the development of silkworm larvae. Contrary with normal treat, the larvae mortality of silkworm in either Bt transgenic rice raw flour treat or Bt transgenic rice cooked flour treat, was not significantly different. The variances in weight of silkworm larvae, the number of grown silkworm, the number of cocoons, the weight of cocoons and cocoon layers at different periods were significant at 0.01 level. In addition, the sub-micro-structure of midgut of silkworm larvae in Bt transgenic rice raw flour treat changed clearly via pathological analysis. Micro-down of midgut cells became shorter and thicker. The number of mitochondrion and rough endoplasmic reticulum reduced significantly. No significant differences ( $P > 0.05$ ) were observed in the above aspects between Bt transgenic rice cooked flour treat and the controls. Therefore, Bt transgenic rice lost the toxicity capacity due to the denaturation of Bt toxin protein after cooking.

Key words: Bt transgenic rice; *Bombyx mori* L.; Sub-micro-structure of midgut

自 20 世纪 80 年代中期以来, 利用转基因技术将苏云金杆菌(*Bacillus thuringiensis*, Bt) 杀虫蛋白基因如 *cry1 Ab*、*cry1 Ac* 等导入农作物, 使其获得抗

虫性的研究已取得巨大进展, Bt 玉米、Bt 棉花、Bt 马铃薯等已在北美等地进行大面积商品化应用<sup>[1]</sup>。水稻是世界上最重要的粮食作物之一, 大约有半数

收稿日期: 2001-01-02

基金项目: 国家植物转基因专项(J2000-B-009), 浙江省重大项目(991102004-002) 和美国洛氏基金资助项目(2000FS020)

作者简介: 王忠华(1972-), 男, 浙江开化人, 现为浙江大学博士生, 主要从事水稻生物技术育种及安全性评价研究。Tel: 0571-6971405; Fax:

0571-6971202; E-mail: zhonghuawang@hotmail.com

以上的人口以稻米为主食。但是,由于虫害造成的损失每年达数亿美元。因此,转 Bt 基因水稻也具有重大的应用前景。虽然迄今尚无商品化应用的实例,但在水稻中,国内外获得 Bt 转基因抗虫植株的报道已有不少<sup>[2-10]</sup>。我们与加拿大渥太华大学合作,利用农杆菌介导法成功地将密码子经过优化的 *cry1 Ab* 基因导入到多个水稻品种中<sup>[11]</sup>,并从粳稻品种“秀水 11”的转基因株后代中获得了对二化螟等 8 种鳞翅目害虫表现高抗的 Bt 水稻“克螟稻”<sup>[12,13]</sup>。

水稻作为一种重要粮食作物,其转基因产品的商品化必须建立在一系列食品安全性和生态风险性评价的基础之上。目前大多数转基因植株采用组成型启动子 *CaMV35S* 或 *Ubi* 转化而成,因此杀虫基因在所有组织和器官中都能表达,稻米也不例外。同时,稻米作为大众消费的食品,其食用方式和其它产品又有很大不同,即稻米通常是经蒸煮之后才食用。因此,对其进行安全性评价时需要对此加以考虑。然而,按标准的食品安全性评价方法——人工饲喂小鼠时只能用一般的米粉,而不能用煮熟的米饭。因此,有必要建立起一种新的评价机制和方法。众所周知,家蚕(*Bombyx mori* L.)属于鳞翅目,对 Bt 杀虫蛋白十分敏感<sup>[14]</sup>。笔者以家蚕为饲食对象,在桑叶上人工撒上 Bt 水稻的米粉研究了 Bt 转基因水稻生米粉与熟米粉对家蚕生长发育的影响及其病理学机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

试验所用水稻为晚粳品种秀水 11(用作非 Bt 转基因水稻对照),以及用其转化育成的一个 Bt 转基因纯合品系“克螟稻 2 号”(KMD2)。KMD2 系用农杆菌介导法培育而成,除 *cry1 Ab* 基因外,还串联排列着 *gus A*(编码  $\beta$ -葡萄糖苷酸酶)、*hpt*(编码潮霉素磷酸转移酶)和 *npt II*(编码新霉素磷酸转移酶)等基因<sup>[11-13]</sup>。用于试验的 KMD2 和秀水 11 种子系 1999 年产于浙江大学华家池校区实验农场,整个生育期未曾喷施化学农药。供试种子先用 Satake 脱壳机和精米机加工成精米,一部分直接磨成米粉;一部分稻米先煮熟后烘干,再磨成细米粉。两部分均用直径为 100 目的筛网过筛。

试验选用的家蚕品种为新抗×白云,桑树品种为湖桑 197。

### 1.2 家蚕的饲养及有关数据的统计

供试家蚕首先用桑叶喂养至 3 龄第 2 天,然后分别将秀水 11 生米粉、熟米粉及 KMD2 生米粉、熟米粉均匀地喷洒在桑叶上进行喂养,喂养温度为 25℃。每天喂叶 3~4 次。每个处理为 30 头幼虫,重复 3 次。在幼虫期每隔 3 d 调查家蚕幼虫致死率并称取每条幼虫体重。上簇后统计结茧数和死笼率,并对全茧量和茧层量进行称量,计算茧层率。

### 1.3 Bt 杀虫蛋白的测定-ELISA 分析

Envirologix *Cry1 Ab*/*Cry1 Ac* 平板试剂盒均由美国 Envirologix 公司提供。包括一块包埋好抗体的 96 孔(12×8)平板及配套试剂,4 个 *Cry1 Ab* 标样:浓度分别为 0、0.5、2.5 和 5.0 ng/g。

测定时分别称取秀水 11 和 KMD2 细米粉 20 mg,放入 1.5 ml 的离心管中,然后每管加抽提液 500  $\mu$ l,并将离心管置于震荡器上剧烈震荡几秒钟,进行抽提。离心后,取上清液 10  $\mu$ l 稀释 51 倍进行测定。需注意的是要保证稀释溶液 *Cry1 Ab* 浓度不超过标样的最高浓度 5 mg/kg(通过预试验观看溶液的显色即能估计)。

测定按照试剂盒说明的方法进行。每次试验同时做 1~2 个重复的 *Cry1 Ab* 标样,用以制作标准曲线。加样及测定都严格按说明书上的步骤在规定的时间内完成。所有结果均由酶标仪读取,设置波长为 450 nm。先将结果换算成单位干重(g)含有的 Bt 杀虫蛋白量( $\mu$ g),然后根据家蚕摄入米粉的总量计算出家蚕摄入的 Bt 蛋白总量。

### 1.4 病理切片电镜分析

喂养至 5 龄 4 d 后,分别取经秀水 11 生米粉、KMD2 生米粉和熟米粉饲养的家蚕进行中肠病理切片电镜分析,由本校试验中心电镜室完成。主要实验步骤如下:将中肠切成 2 mm 长的小块→戊二醛固定过夜→0.1 mol/L 磷酸缓冲液漂洗 3 次,每次 15 min→2% 锇酸固定 1 h→0.1 mol/L 磷酸缓冲液漂洗 3 次,每次 15 min→脱水(50%乙醇 15 min;70%乙醇 15 min;80%乙醇 15 min;90%乙醇 15 min;95%乙醇 15 min;无水乙醇 20 min;丙酮 20 min)→渗透(1:1 的 Spurr 包埋剂:丙酮渗透 1 h;1:3 的 Spurr 包埋剂:丙酮渗透 3 h;全 Spurr 包埋剂渗透过夜)→70℃聚合 8 h→修块,超薄切片→染色(醋酸双氧铀染液染 15 min,漂洗;再用柠檬酸铅染液染 15 min,漂洗)→电镜观察(日本电子 JEM-200EX 透射电镜,加速电压为 60 kV)。

## 2 结果与分析

### 2.1 家蚕进食中摄入的 Bt 杀虫蛋白总量

我们对家蚕进食过程中摄入 Bt 杀虫蛋白的总量进行了计算与检测,结果见表 1。表 1 中摄入米粉量按食下量占给桑量的比例进行计算,因为我们在试验过程中发现每次喂叶时基本上都剩余 1/4。

表 1 家蚕进食中摄入的 Bt 杀虫蛋白总量

Table 1 Bt insecticidal protein total content assimilated by silkworms during feed volume

材料 Material	施加米粉量 Flour content added (g)	摄入米粉量 Flour content assimilated (g)	每克米粉的 Bt 杀虫蛋白含量 Bt protein content percent gram rice flour ( $\mu\text{g/g}$ )	摄入 Bt 杀虫蛋白总量 Bt protein total content absorbed ( $\mu\text{g}$ )
秀水 11 生米粉 Xiushui11 raw flour	75.14	56.36	0.00	0.00
秀水 11 熟米粉 Xiushui11 cooked flour	81.11	60.84	0.00	0.00
KMD2 生米粉 KMD2 raw flour	65.69	49.26	2.01 $\pm$ 0.07	99.01
KMD2 熟米粉 KMD2 cooked flour	79.19	59.42	0.00	0.00

## 2.2 不同处理对家蚕生长发育的影响

**2.2.1 对家蚕幼虫体重与致死率的影响** 不同处理不同时期对家蚕幼虫体重与致死率的影响结果见图 1、图 2。不同处理对家蚕幼虫的致死率无多大影响,而对幼虫的体重影响较大。对相同时期不同处理间家蚕幼虫体重的差异进行单因素方差分析,发现秀水 11 生米粉与 KMD2 生米粉及 KMD2 生米粉与熟米粉处理间存在极显著差异。由此表明, KMD2 生米粉对家蚕的生长发育有明显的抑制作用。

**2.2.2 对家蚕幼虫中肠亚显微结构的影响** 家蚕中肠亚显微结构的电镜分析表明, KMD2 生米粉处理与对照相比,其中肠杯形细胞、圆筒形细胞和中肠内壁的微绒毛明显稀疏而短小(图 3),杯形细胞和圆筒形细胞的线粒体和粗面型内质网数量明显减少(图 3 和图 4)。同时,圆筒形细胞中粗面型内质网

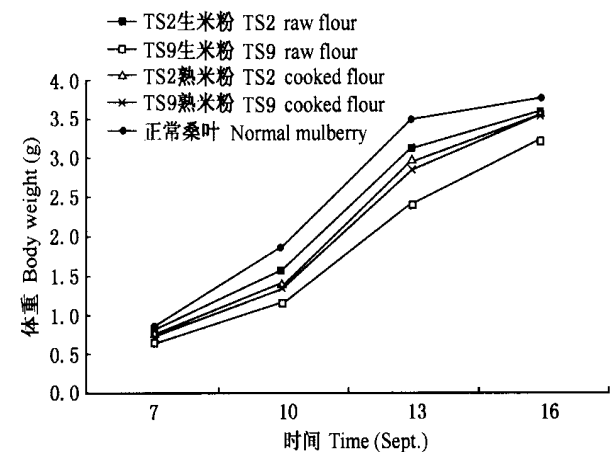


图 1 不同处理家蚕体重随时间的变化

Fig. 1 The body weight of silkworms changed with time in different treats

由表 1 可见,家蚕摄入 KMD2 生米粉的数量最少,但摄入的 Bt 杀虫蛋白总量却高达 99.01  $\mu\text{g}$ ;其它处理则未检测到该种蛋白。

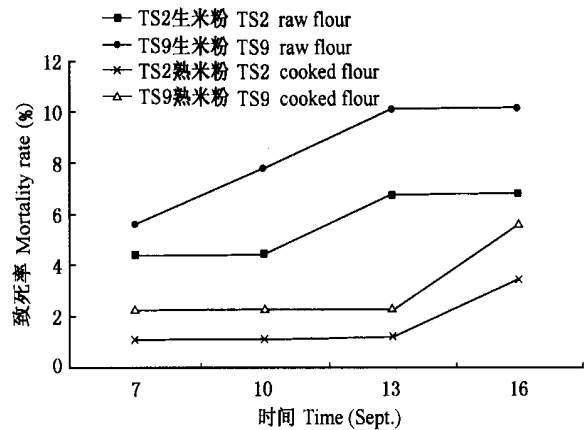


图 2 不同处理家蚕幼虫致死率随时间的变化

Fig. 2 Mortality rate of silkworms changed with time in different treats

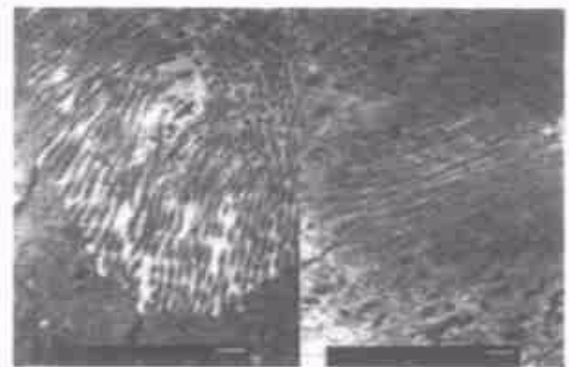


图 3 KMD2 生米粉处理(左)与对照秀水 11 生米粉处理(右)家蚕中肠杯形细胞微绒毛与线粒体分布的差异

Fig. 3 The difference of distribution of micro-down and mitochondrion between KMD2 raw flour treat (left) and Xiushui 11 raw flour treat (right) in cup-shaped cells of silkworm larvae midgut

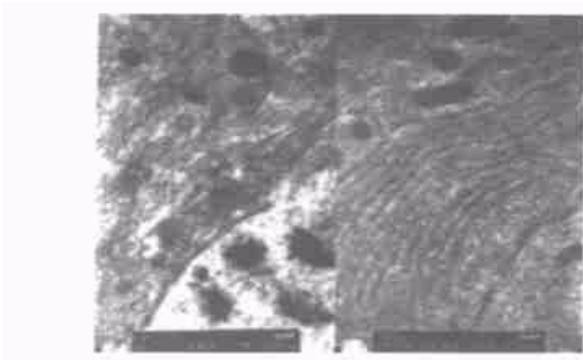


图4 KMD2 生米粉处理(左)与对照秀水 11 生米粉处理(右)家蚕中肠圆筒形细胞粗面型内质网分布的差异

Fig. 4 The difference of distribution of rough endoplasmic reticulum between KMD2 raw flour treat (left) and Xiushuil1 raw flour treat (right) in round-shaped cells of silk worm larvae midgut

和线粒体的形态均发生了不同程度的变化(如粗面型内质网的池状变粗等)。由此可见,Bt 杀虫蛋白

通过与家蚕中肠上皮细胞受体特异性结合进而影响中肠的亚显微结构,最终显著降低家蚕的消化和吸收能力。

### 2.3 对熟蚕结茧率和茧层率的影响

熟蚕上簇后,对家蚕的结茧率和茧层率进行了调查与统计,结果见表 2。由表 2 可见,KMD2 生米粉处理与其他处理相比,其熟蚕数、结茧数、结茧率、全茧量和茧层量明显偏少。经单因素方差分析,发现 KMD2 生米粉处理的全茧量和茧层量与其他处理间有极显著差异。由于 KMD2 生米粉处理的家蚕全茧量和茧层量呈相同比例的减少,因此茧层率与其它处理差别不大。

另外,对熟蚕的老熟整齐度进行了统计,结果见图 5。由图 5 可见,KMD2 生米粉处理的熟蚕老熟时间明显迟于其它处理。9 月 19 日 KMD2 生米粉处理的正处于盛熟期,而其它处理的熟蚕结茧已基本完成。

表 2 不同处理对熟蚕结茧率和茧层率的影响

Table 2 The effect of different treats on the rate of cocoon and cocoon layer of adult silk worm

处理 Treats	熟蚕数 No. of adult silk worm	结茧数 No. of cocoon	结茧率 The rate of cocoon (%)	全茧量 The weight of cocoon (g)	茧层量 The weight of cocoon layer (g)	茧层率 The cocoon layer rate (%)
秀水 11 生米粉 Xiushuil1 raw flour	84	79	94.05	1.54 ± 0.22	0.34 ± 0.04	22.08
秀水 11 熟米粉 Xiushuil1 cooked flour	78	70	89.74	1.41 ± 0.20	0.30 ± 0.06	21.28
KMD2 生米粉 KMD2 raw flour	85	78	91.76	1.52 ± 0.18	0.33 ± 0.04	21.71
KMD2 熟米粉 KMD2 cooked flour	88	85	96.59	1.55 ± 0.18	0.33 ± 0.05	21.29
正常桑叶 Normal mulberry	83	80	96.39	1.58 ± 0.18	0.34 ± 0.04	21.52

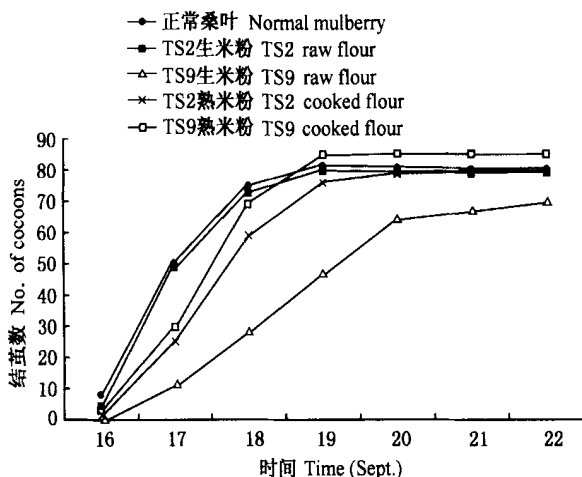


图 5 不同处理熟蚕结茧数随时间的变化

Fig. 5 No. of cocons changed with time in different treats

## 3 讨论

细胞学研究已经证实,Bt 杀虫晶体蛋白(insecticidal crystal proteins, ICP)通过破坏昆虫中肠上皮引起昆虫饥饿、麻痹和败血,最终导致昆虫死亡<sup>[14]</sup>。当昆虫取食 Bt ICPs 后,这些蛋白在昆虫中肠内碱性环境条件下( $pH > 8$ )溶解并进一步被蛋白酶水解成 65 ~ 70kD 带有 N 末端具杀虫活性的蛋白质<sup>[15]</sup>,这些具杀虫活性的蛋白质穿过围食膜小孔并与中肠上皮细胞膜上的特异蛋白质受体相结合<sup>[16]</sup>,导致细胞内 pH 值上升,破坏细胞的渗透平衡,细胞肿胀破裂,最终导致昆虫停止进食而死亡<sup>[17]</sup>。cry1 Ab 是一类对鳞翅目昆虫具有特异毒杀作用的 Bt 基因,而

家蚕属于昆虫纲鳞翅目蛾亚目蚕蛾科,其肠液呈强碱性,pH值一般为9.2~9.8。由此,家蚕进食 *cry1 Ab* ICP后可引起中肠细胞肿胀破裂,最终导致家蚕停止进食而死亡。在本试验中并未发现家蚕进食 *cry1 Ab* ICP后大量死亡的现象,这可能是由于家蚕摄入的 *cry1 Ab* ICP含量未达到致死剂量造成的。

在试验中,发现家蚕进食转基因纯合品系 KMD2 生米粉后,其体重、全茧量和茧层量明显轻于其它处理,熟蚕数和结茧数也明显少于其它处理。同时还发现其熟蚕整齐度明显迟于其它处理。这与家蚕的消化和吸收能力密切相关,因为我们在试验过程中发现进食撒上抗虫转基因纯合品系生米粉后家蚕的食桑量明显少于其它处理。进一步的家蚕病理切片电镜分析发现,其中肠亚显微结构发生了明显的变化,中肠内壁杯形细胞和圆筒形细胞的微绒毛明显变粗、变短,同时发现中肠细胞线粒体和粗面型内质网的数量明显减少。由此表明,进食抗虫转基因纯合品系生米粉后,由于生米粉中具有较高含量的 Bt 杀虫蛋白,影响了家蚕主要消化器官——中肠的亚显微结构,进而降低家蚕的消化和吸收功能,最终导致家蚕生长发育的延缓和推迟。

在本次试验中,还发现家蚕进食抗虫转基因纯合品系熟米粉后,其体重、全茧量和茧层量、熟蚕数、结茧数、熟蚕整齐度和食桑量等生理指标与对照相比,均未发生明显变化;病理切片电镜分析也未发现其中肠亚显微结构有明显变化。这是 Cry1 Ab 蛋白在蒸煮过程中发生变性的结果。这进一步验证了 Bt 转基因抗虫水稻稻米经蒸煮后的确检测不到 Cry1 Ab 蛋白。也表明利用熟米粉评价 Bt 转基因抗虫水稻的食品安全性是可行的。

## References

- [ 1 ] Wang Z H, Cui H R, Shu Q Y, et al. The review on the studies of insect resistant plants with *Bacillus thuringiensis* crystal protein genes. *Chinese Bulletin Botany*, 1999, 16(1): 51 - 58. (in Chinese)  
王忠华, 崔海瑞, 舒庆尧, 等. Bt 杀虫基因与 Bt 转基因抗虫植物研究进展. *植物学通报*, 1999, 16(1): 51 - 58.
- [ 2 ] Xie D X, Fan Y L, Ni P C. Obtaining transgenic rice plants by introducing *Bacillus thuringiensis* insecticidal gene into rice variety Zhonghua11. *Science in China (Series B)*, 1991, 21(8): 830 - 834. (in Chinese)  
谢道昕, 范云六, 倪丕冲. 苏云金芽孢杆菌杀虫基因导入中国栽培水稻品种中花 11 号获得转基因植株. *中国科学(B 辑)*, 1991, 21(8): 830 - 834.
- [ 3 ] Fujimoto H, Itohet K, Yanamoto M, et al. Insect resistant rice generated by introduction of a modified endotoxin gene from *Bacillus thuringiensis*. *Bio/ Technology*, 1993, 11(10): 1151 - 1155.
- [ 4 ] Wunn J, Kloti A, Burkhardt P, et al. Transgenic indica rice breeding line IR58 expressing a synthetic cry1A(b) gene from *Bacillus thuringiensis* provides effective insect pest control. *Bio/ Technology*, 1996, 14(2): 171 - 176.
- [ 5 ] Ghareyazie B, Alinia F, Menguito C A, et al. Enhanced resistance to two stem borers in an aromatic rice containing a synthetic cry1A(b) gene. *Molecular Breeding*, 1997, (3): 401 - 414.
- [ 6 ] Wu C, Fan Y, Zhang C, et al. Transgenic fertile japonica rice plants expressing a modified cry1A(b) gene resistant to yellow stem borer. *Plant Cell Reports*, 1997, (17): 129 - 132.
- [ 7 ] Nayak P, Basu D, Das S, et al. Transgenic elite indica rice plants expressing CryI Ac & endotoxin of *Bacillus thuringiensis* are resistant against yellow stem borer (*Scirpophaga incertulas*). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, 94: 2111 - 2116.
- [ 8 ] Cheng X, Sardana R, Kaplan H, et al. Agrobacterium-mediated rice plants expressing synthetic cry1A(b) and cry1A(c) genes are highly toxic to striped stem borer and yellow stem borer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998, 95: 2767 - 2772.
- [ 9 ] Datta K, Vasquez A, Tu J, et al. Constitutive and tissue-specific differential expression of the cry1A(b) gene in transgenic rice plants conferring resistance to rice insect pest. *Theor. Appl. Genet.* 1998, 97: 20 - 30.
- [ 10 ] Tu J, Datta K, Alam M F, et al. Expression and function of a hybrid Bt toxin gene in transgenic rice conferring resistance to insect pest. *Plant Biotechnology*, 1998, 15(4): 195 - 203.
- [ 11 ] Xiang Y B, Liang Z Q, Gao M W, et al. Agrobacterium-mediated transformation of insecticidal *Bacillus thuringiensis* cry1 Ab and cry1 Ac genes and their expression in rice. *Chinese J. Biotechnology*, 1999, 15(4): 494 - 500. (in Chinese)  
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 cry1 Ab 和 cry1 Ac 在水稻中的遗传转化及蛋白表达. *生物工程学报*, 1999, 15(4): 494 - 500.
- [ 12 ] Shu Q Y, Ye G Y, Cui H R, et al. Development of transgenic *Bacillus thuringiensis* rice resistant to rice stem borers and leaf folders. *J. Zhejiang Agricultural University*, 1998, 24: 579 - 580. (in Chinese)  
舒庆尧, 叶恭银, 崔海瑞, 等. Bt 转基因水稻“克螟稻”选育. *浙江农业大学学报*, 1998, 24(6): 579 - 580.
- [ 13 ] Shu Q Y, Ye G Y, Cui H R, et al. Transgenic rice plants with a synthetic cry1 Ab gene from *Bacillus thuringiensis* were highly resistant to eight lepidopteran rice pest species. *Molecular Breeding*, 2000, 6: 433 - 439.
- [ 14 ] Manthavan S, Sudha P M, Pechimuthu S M. Effect of *Bacillus thuringiensis* on the midgut cells of *Bombyx mori* larvae: a histopathological and histochemical study. *J. Invert. Pathol.* 1989, 53: 217 - 227.
- [ 15 ] Koziel M G, Carozzi N B, Currier T C, et al. The insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*: past, present and further uses. *Biotechnol. Genet. Engin. Rev.* 1993, 11: 171 - 228.
- [ 16 ] Bravo A, Hendrickx K, Jansens S, et al. Immunocytochemical localization of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins to lepidopteran and coleopteran midgut membranes. *J. Invert. Pathol.* 1992, 60: 247 - 253.
- [ 17 ] Gill S S, Cowles E A, Pietrantonio P V. The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. *Annu. Rev. Entomol.* 1992, 37: 615 - 636.