

温湿度处理对 *Bt* 棉杀虫蛋白表达的影响

王永慧^{1,2}, 陈建平², 蔡立旺², 张祥¹, 陈源¹, 陈德华^{1*}

(1. 扬州大学江苏省作物遗传生理重点开放实验室, 江苏扬州 225009; 2. 江苏沿海地区农业科学研究所 / 农业部沿海盐碱地农业科学观测试验站, 江苏盐城 224401)

摘要:以转 *Bt* 基因抗虫棉杂交种泗杂 3 号为试验材料, 在人工气候室内设置 4 种温度和湿度组合(高温高湿度、高温低湿度、低温高湿度、低温低湿度), 研究了不同生育期温湿度胁迫及胁迫解除后 *Bt* 棉杀虫蛋白表达量的变化。结果表明, 温湿度胁迫显著抑制 *Bt* 棉杀虫蛋白的表达。同一生育期, 高温高湿度下 *Bt* 蛋白含量降幅最小, 胁迫解除后恢复能力最强; 低温低湿度下 *Bt* 蛋白含量降幅最大, 恢复能力最弱。不同时期温湿度胁迫下 *Bt* 蛋白含量降低幅度表现为盛铃期 > 盛花期 > 盛蕾期, 胁迫解除后 *Bt* 蛋白的恢复水平表现出相反的趋势。温湿度胁迫及胁迫解除后 *Bt* 蛋白表达量的恢复与胁迫类型、棉花生育期密切相关。

关键词: 杀虫蛋白; 温湿度胁迫; *Bt* 棉

中图分类号: S562.01 **文献标志码:** A

文章编号: 1002-7807(2013)01-0063-05

Effect of Combination Stress of Temperature and Humidity on Insecticidal Protein Expression of *Bt* Transgenic Cotton

WANG Yong-hui^{1,2}, CHEN Jian-ping², CAI Li-wang², ZHANG Xiang¹, CHEN Yuan¹, CHEN De-hua^{1*}

(1. Key Laboratory of Crop Genetics and Physiology of Jiangsu Province, Yangzhou, Jiangsu 225009, China; 2. Institute of Agricultural Sciences of Jiangsu Coastal Area / Observation and Experimental Station of Saline land of Coastal Area, Ministry of Agriculture, Yancheng, Jiangsu 224001, China)

Abstract: Using insect-resistant transgenic cotton Sikang 3 as material, four combined stress was designed to study the effect of combination stress of temperature and humidity and its recovery on insecticidal protein expression of *Bt* transgenic cotton which was high temperature-humidity, low temperature-humidity, high temperature with low humidity and low temperature with high humidity. The results showed that combined stress decreased insecticidal protein content. Under the same growth period, the decrease amplitude of *Bt* content was lowest with high temperature-humidity stress, while highest with low temperature-humidity stress. However, the recovery level of *Bt* content after released from combined stress was highest with high temperature-humidity stress, while lowest with low temperature-humidity stress. Under the same stress, the decrease amplitude of *Bt* content was low at peak square period, middle at peak flowering period, high at peak boll period under four combined stress, however, the recovery level of *Bt* content after stress stopped performed reverse trend. These results suggested that the decrease amplitude of *Bt* content under combination stress of temperature and humidity stress and recovery level of *Bt* content after stress stopped was closely associated with stress types and cotton development stages.

Key words: *Bt* protein; combination stress of temperature and humidity; *Bt* cotton

国内外研究一致认为转 *Bt* 基因棉花的抗虫性表现不稳定, 除了 *Bt* 棉遗传本身存在的不同生育阶段抗虫性表达差异较大, 即在时间上呈前期强、后期弱的特征外^[1-2], 还认为不良的环境对

抗虫性表达具有较大的影响, 即 *Bt* 棉在不良的环境条件下表现出抗虫性显著下降或不抗虫现象^[3-5]。目前相关研究主要集中在干旱、水分及高温等对 *Bt* 棉抗虫性的影响, 研究认为高温胁迫

收稿日期: 2012-02-27

作者简介: 王永慧(1983-), 男, 博士, 助研, huiyw2008@yahoo.cn; * 通讯作者, dehuachen2002@yahoo.com.cn

基金项目: 国家自然科学基金项目(30971727, 31171479); 江苏省高校自然科学研究重大项目(10KJA210057); 国家转基因生物新品种培育重大专项(2012ZX08013007-003)

后,棉叶的生理代谢活性下降,Bt蛋白表达量明显降低^[6-8];同时前人用生测试验也证明低温环境下棉叶抗虫性明显偏低,棉铃幼虫存活率提高^[9-10]。但上述研究基本以单个因子进行,而棉花生育过程是受自然环境条件特别是温度和湿度等因子的综合影响,单个因子往往不能完全反映自然温湿度互作条件下对Bt蛋白表达量的影响;而且在胁迫解除后,Bt棉杀虫蛋白表达量的恢复状况等也有待于进一步研究。因此,本文通过探讨棉花生育期关键阶段不同温度和湿度胁迫对Bt棉Bt蛋白表达量以及胁迫解除后Bt蛋白表达量恢复能力的影响,以期对Bt棉安全生产应用提供理论和实践指导。

1 材料和方法

1.1 试验材料

试验于2008—2009年在扬州大学江苏省栽培生理重点实验室进行,采用盆栽方法。供试土壤为沙壤土,含有机质1.88%,水解氮134.7 mg·kg⁻¹,速效磷22.5 mg·kg⁻¹,速效钾81.3 mg·kg⁻¹。试验所用盆钵直径30 cm,高27 cm,每盆装土11 kg,土壤自然风干、过筛去杂后装盆,浇水沉实。供试品种为转单价基因(*Cry1Ac*)抗虫棉杂交种泗杂3号。营养钵育苗,2年均是在4月5日播种,36 d后将棉苗移栽于盆中。管理措施同一般大田生产。

1.2 试验设计

试验设置温度和湿度2个处理;温度处理设高温(37℃)、低温(17℃)2个水平,湿度处理设高湿度(95%)和低湿度(50%)2个水平。不同温湿度处理水平相互交叉,共计4个组合处理,分别为高温高湿度(HH表示)、高温低湿度(HD表示)、低温高湿度(DH表示)和低温低湿度(DD表示),于棉花盛蕾期、盛花期、盛铃期,用人工气候箱对棉株进行温湿度胁迫处理。3个时期对照处理分别设昼/夜温度为26℃/15℃、30℃/15℃、32℃/20℃,湿度为60%、70%和70%。以上温度控制误差±1℃,湿度控制误差±5%,光量子通量密度为800 μmol·m⁻²·s⁻¹。用称重法控制土壤含水量,待胁迫前调节土壤相对含水量,使之维持在70%±5%。胁迫48 h后将植株移至正常温湿度环

境中恢复。分别于胁迫处理后的0,24,48 h和恢复正常温湿度后的24,48,96 h(分别为胁迫后72,96,144 h),取主茎倒4叶,液氮速冻保存。

1.3 Bt蛋白含量的提取和测定

称取0.5 g的叶片鲜样,加入3 mL pH 7.5的磷酸缓冲液中,冰浴研磨后放入4℃冰箱中提取4 h以上,离心15 min,弃去残渣,取上清液保存备用。采用酶联免疫吸附分析法(Enzyme-linked immunosorbent assays, ELISA)测定,药盒由中国农业大学提供,每处理3次重复。酶标仪波长为450 nm,每次检测均用Cry1A蛋白标样制作Bt蛋白浓度和吸光值关系的标准曲线,根据标准曲线求出样品中的Bt杀虫蛋白含量,换算成鲜质量每克杀虫蛋白含量,用ng·g⁻¹表示。用方差分析和Duncan多重比较进行数据分析。

2 结果与分析

2.1 盛蕾期温湿度胁迫及其恢复对叶片Bt蛋白含量的影响

图1表明,盛蕾期在相同湿度环境下,高温处理叶片Bt蛋白含量在0~48 h内稍有波动,但变化幅度不大。而低温处理24 h后,叶片Bt蛋白含量开始下降;且随着胁迫时间的延长,含量有所降低。相同温度下,不同湿度间差异不明显,温度和湿度间交互作用未达显著水平。恢复正常温湿度后,叶片Bt蛋白表达量呈逐步上升的趋势,72~144 h内含量大幅度增加,4个处理下叶片Bt蛋白含量都能恢复且超过对照蛋白水平;与对照处理相比,叶片Bt蛋白含量提高了7.7%~26.3%。不同处理间恢复程度不一样,具体表现为HH>HD>DH>DD。以上结果说明了盛蕾期温度和湿度胁迫对棉叶Bt蛋白表达量影响较小,胁迫解除后,Bt蛋白表达量存在恢复和补偿效应。

2.2 盛花期温湿度胁迫及其恢复对叶片Bt蛋白含量的影响

图2表明,盛花期温湿度胁迫持续48 h,叶片Bt蛋白含量出现了明显的下降。相同湿度下,高温处理叶片Bt蛋白含量在0~24 h内变化较小,24 h后大幅下降;低温处理对棉花叶片胁迫强度更大,48 h内明显低于高温胁迫,两者之间的差异达到极显著水平($P<0.01$)。湿度间差异及

温湿度交互作用与盛蕾期一致,未达显著水平。胁迫解除后,叶片 *Bt* 蛋白含量变化总体呈抛物线型,处理 48~96 h 呈上升趋势,96~144 h 又表现一定程度的下降,至处理 144 h 叶片 *Bt* 蛋白含量只相当于对照的 79.6%~85.2%。说明盛花期

温湿度胁迫持续 48 h 对叶片 *Bt* 蛋白表达量影响较大,不能使 *Bt* 蛋白含量恢复到未胁迫前水平。处理间 *Bt* 蛋白含量的差异与盛蕾期基本一致,都是以 HH 处理最高,DD 处理最低。

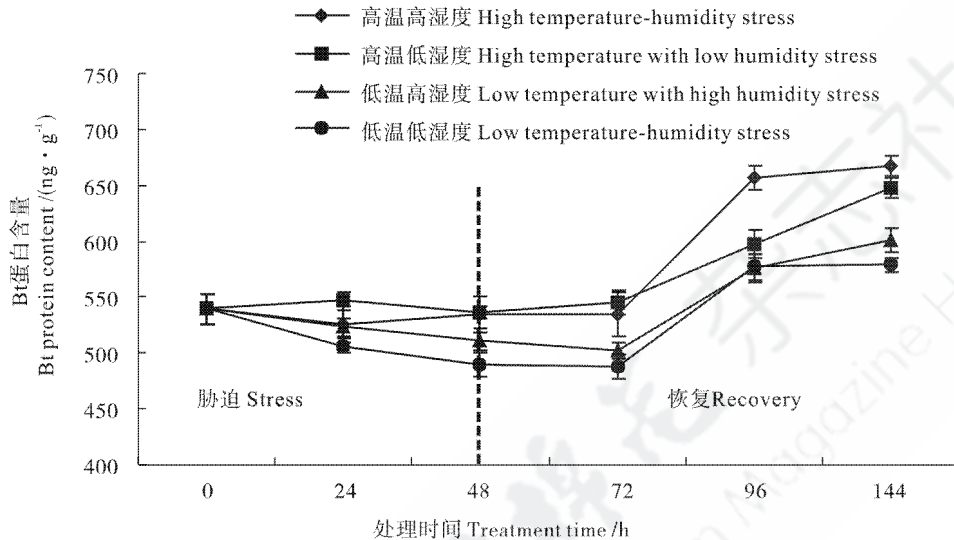


图 1 盛蕾期温湿度胁迫及其恢复对叶片 *Bt* 蛋白含量的影响

Fig. 1 Effect of combination stress of temperature and humidity and its recovery on leaf *Bt* protein content during peak square period

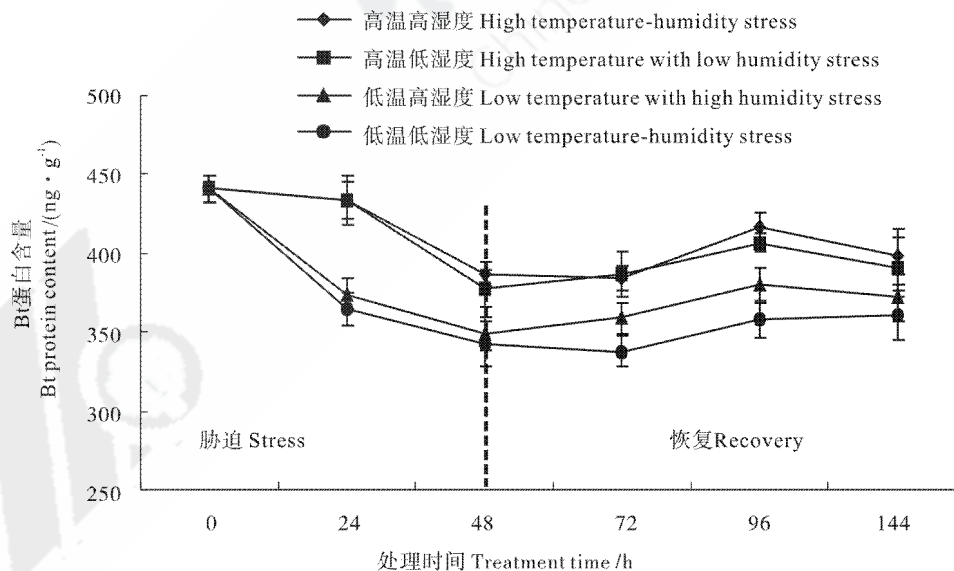


图 2 盛花期温湿度胁迫及其恢复对叶片 *Bt* 蛋白含量的影响

Fig. 2 Effect of combination stress of temperature and humidity and its recovery on leaf *Bt* protein content during peak flower period

2.3 盛铃期温湿度胁迫及其恢复对叶片 *Bt* 蛋白含量的影响

图 3 表明,盛铃期叶片 *Bt* 蛋白表达量随胁迫时间的延长,呈逐步下降的趋势。胁迫至 48 h,叶片 *Bt* 蛋白含量降低了 41.6%~51.3%。不同温

度间仍以低温处理叶片 *Bt* 蛋白含量低;在相同温度下,不同湿度处理 0~24 h 差异较小,24 h 后差异显著,在 24~144 h 内叶片 *Bt* 蛋白含量一直表现为高湿度>低湿度。方差分析表明盛铃期温度与湿度间存在显著的交互作用,低温低湿度环

境下叶片 Bt 蛋白表达量最低。以上结果说明盛铃期温湿度胁迫下叶片 Bt 蛋白表达量不能恢

复,高、低温下,低湿度环境均会加剧 Bt 棉抗虫性的下降。

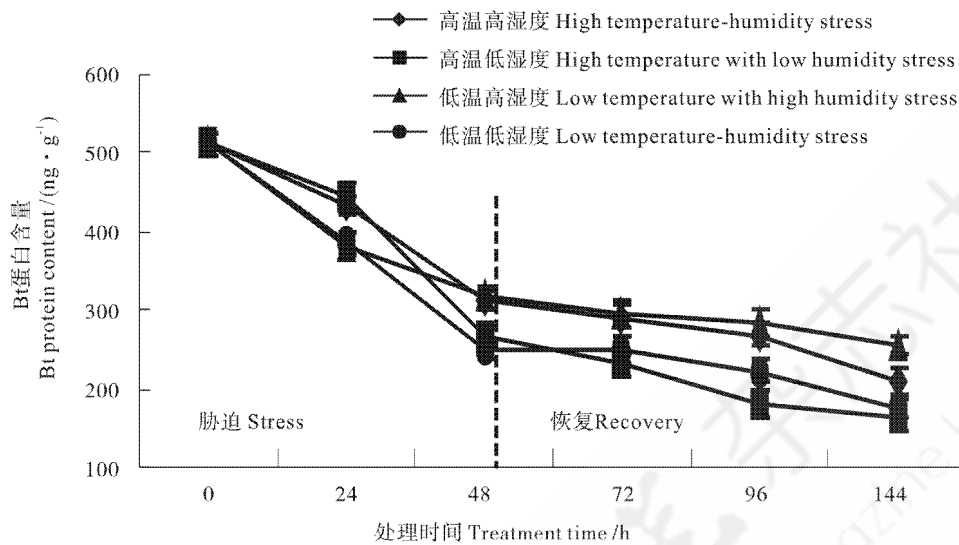


图3 盛铃期温湿度胁迫及其恢复对叶片 Bt 蛋白含量的影响

Fig. 3 Effect of combination stress of temperature and humidity and its recovery on leaf Bt protein content during peak boll period

3 结果与讨论

周冬生等^[9]研究不同温度处理对转 Bt 基因棉离体叶片抗虫活性的影响时发现,低温(16 ℃)下转基因棉花对棉铃虫的抗性明显降低,高温(36 ℃)下随处理时间的推进,幼虫累计校正死亡率和低温处理相差无几。本研究发现,温、湿度胁迫降低了抗虫棉 Bt 蛋白的表达量。在高湿度或低湿度环境下,高温在胁迫前 24 h 内对叶片 Bt 蛋白表达影响小,Bt 蛋白含量下降幅度较小,24 h 后随着胁迫时间的延长,降幅逐步增大;而低温处理叶片 Bt 蛋白含量下降时间出现早,整个胁迫期降低幅度大。在高温或低温环境下,高、低湿度处理间叶片 Bt 蛋白表达量在盛蕾期和盛花期差异较小,至盛铃期两者差异明显,达显著水平。4 个温湿度处理组合在不同生育期均表现为低温低湿度处理在胁迫期间及解除胁迫后 Bt 蛋白的含量最低。温度和湿度的交互作用也进一步说明,盛铃期低湿度环境会加剧叶片 Bt 蛋白含量的下降。

已有研究表明,在干旱、涝灾等逆境胁迫解除后,Bt 棉叶片中 Bt 蛋白含量及抗虫性仍有一定程度的恢复,其恢复水平与胁迫程度、品种密

切相关^[7]。本研究发现,盛蕾期温湿度胁迫后 Bt 蛋白表达量可以恢复,恢复后含量甚至超过原有的水平;盛花期虽有所恢复,但 Bt 蛋白表达量未能恢复到胁迫前水平;而到了盛铃期,Bt 蛋白含量不但完全不能恢复,而且随着时间的延长而快速下降。由此可见,不同温湿度胁迫类型、不同生育期也能影响抗虫棉叶片 Bt 蛋白表达量的恢复。

综上所述,不良的温度和湿度环境都能抑制 Bt 棉杀虫蛋白的表达,其中温度对 Bt 蛋白表达量影响较湿度大。随着棉花生育进程,温湿度胁迫下 Bt 棉叶片 Bt 蛋白表达量降幅增大,胁迫解除后恢复能力也随之下降,不同温湿度处理组合以低温低湿度胁迫的 Bt 蛋白表达量下降快,解除胁迫后恢复能力差。因此,生产上在盛铃期要注意极端气候特别是高温低湿和低温低湿气候对抗虫性的影响,根据抗虫性的下降程度及时调整棉铃虫等相关害虫的防治策略,为 Bt 棉的安全应用提供保障。

参考文献:

[1] 陈松,吴敬音,周宝良,等. 转 Bt 基因棉 Bt 毒蛋白表达量的时空变化[J]. 棉花学报,2000,12(4):189-193.

CHEN Song, Wu Jing-yin, Zhou Bao-liang, et al. On the tempo-

- ral and spatial expression of Bt toxin protein in Bt transgenic cotton[J]. Cotton Science, 2000, 12(4): 189-193.
- [2] 邢朝柱,靖深蓉,崔学芬,等. 转 *Bt* 基因棉杀虫蛋白含量时空分布及对棉铃虫产生抗性的影响[J]. 棉花学报, 2001, 13(1): 11-15.
XING Chao-zhu, Jing Shen-rong, Cui Xue-fen, et al. The spatio-temporal distribution of Bt insecticidal protein and the effect of transgenic Bt cotton on bollworm resistance [J]. Cotton Science, 2001, 13(1): 11-15.
- [3] PETTIGREW W T, Adamczyk J J. Nitrogen fertility and planting date effects on lint yield and Cry1Ac (*Bt*) endotoxin production [J]. Agronomy Journal, 2006, 98: 691-697.
- [4] DONG He-zhong, Li Wei-jiang. Variability of endotoxin expression in Bt transgenic cotton [J]. Journal of Agronomy and Crop Science, 2007, 193: 21-29.
- [5] 王留明,王家宝,沈法富,等. 渍涝与干旱对不同转 *Bt* 基因抗虫棉的影响[J]. 棉花学报, 2001, 13(2): 87-90.
WANG Liu-ming, Wang Jia-bao, Shen Fa-fu, et al. Influences of waterlogging and drought on different transgenic Bt cotton cultivars[J]. Cotton Science, 2001, 13(2): 87-90.
- [6] 夏兰芹,郭三堆. 高温对转基因抗虫棉中 *Bt* 杀虫基因表达的影响[J]. 中国农业科学, 2004, 37(11): 1733-1737.
XIA Lan-qin, Guo San-dui. The expression of Bt toxin gene under different thermal treatments [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2004, 37(11): 1733-1737.
- [7] ROCHESTER I J. Effect of genotype, edaphic, environmental conditions, and agronomic practices on Cry1Ac protein expression in transgenic cotton [J]. The Journal of Cotton Science, 2006, 10: 252-262.
- [8] 陈德华,杨长琴,陈源,等. 高温胁迫对 *Bt* 棉叶片杀虫蛋白表达量和氮代谢影响的研究[J]. 棉花学报, 2003, 15(5): 288-292.
CHEN De-hua, Yang Chang-qin, Chen Yuan, et al. The effects of the high temperature stress on the leaf Bt protein content and nitrogen metabolism of Bt cotton [J]. Cotton Science, 2003, 15(5): 288-292.
- [9] 周冬生,吴振廷,王学林,等. 施肥量和环境温度对转 *Bt* 基因棉抗虫性的影响 [J]. 安徽农业大学学报, 2000, 27(4): 352-357.
ZHOU Dong-sheng, Wu Zhen-ting, Wang Xue-lin, et al. Influence of fertilization and environmental temperature on the resistance of Bt transgenic cotton to cotton bollworm [J]. Journal of Anhui Agricultural University, 2000, 27 (4): 352-357.
- [10] MAHON R, Finnegan J, Olsen K, et al. Environmental stress and the efficacy of Bt cotton [J]. The Australian Cottongrower, 2002, 23(2): 18. ●