

## 转 *Bt* 基因玉米秸秆浸提液对小麦种子萌发的影响

陈小文 祁鑫 王海永 张巧玉 郭玉海 董学会\*

(中国农业大学 农学与生物技术学院,北京 100193)

**摘要** 为研究转 *Bt* 基因玉米秸秆还田后秸秆中外源 *Bt* 蛋白的释放是否会对后茬作物的萌发产生不利影响,本试验以转 *Bt* 基因玉米及其受体品种(非转基因)郑 58 秸秆浸提液作为处理,采用以小麦(多抗一号)为材料进行室内培养,通过测定对小麦发芽率、幼苗生长的影响,比较了不同浸提液对小麦的作用效应。结果表明,2 种秸秆浸提液的质量体积比较低(1:100)时对小麦萌发处理效应与对照差异不大,当浸提液质量体积比为 1:25 时表现轻微抑制作用,以非转基因秸秆表现明显,差异达到显著水平;幼苗的形态上低质量体积比(1:100)的转基因秸秆浸提液处理的株高(9.70 cm)和根长(10.84 cm)均显著高于对照和非转基因玉米秸秆处理,而质量体积比为 1:25 的非转基因秸秆浸提液处理的株高(6.90 cm)和根长(4.28 cm)则明显受到抑制。转基因秸秆浸提液中虽然含有 *Bt* 蛋白,但以不同浓度 *Bt* 蛋白溶液浸种 24 h 对小麦的萌发并没有影响。因此,一定比例的转 *Bt* 基因的玉米秸秆还田对后茬作物的萌发没有不利影响。

**关键词** 小麦;发芽率;*Bt* 蛋白;秸秆浸提液;幼苗生长;玉米

中图分类号 S 512; S 513

文章编号 1007-4333(2011)06-0020-05

文献标志码 A

## Effects of straw extracts of *Bt* transgenic maize on germination of wheat

CHEN Xiao-wen, QI Xin, WANG Hai-yong, ZHANG Qiao-yu, GUO Yu-hai, DONG Xui-hui\*

(College of Agronomy and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

**Abstract** This study was to analyze the effects of different concentrations of two maize (transgenic *Bt* maize and non-transgenic maize) straw extract on germination and seedling growth of wheat. All experiments were investigated by means of bioassay in laboratory. The results showed that both maize straw extract at low concentration (1:100) had no significant effect on wheat germination while high concentration (1:25) inhibited seed germination, especially treated by transgenic *Bt* maize straw extract. At 1:100 concentration transgenic *Bt* maize straw extract significantly increased seedling height and root length, which reached 9.7 and 10.84 cm respectively. However, non-transgenic maize straw extract at concentration of 1:25 significant decreased seedling height (6.9 cm) and root length (4.28 cm), transgenic *Bt* maize straw could release *Bt* protein into aqueous extract, but there was no influence on wheat germination when seed soaked in *Bt* solution for 24 h. Therefore, a certain proportion of *Bt*-maize straw ploughed into soil has no adverse affect on germination of the following crop.

**Key words** wheat; germination percentage; *Bt* protein; straw aqueous extracts; seedlings growth; maize

秸秆还田能改善土壤的理化性质、增加土壤有机质含量、促进作物生长、提高作物的产量和品质<sup>[1-4]</sup>。秸秆还田改善土壤的同时,秸秆腐解也向周围的农业生态环境中释放一些化学物质,从而影响

周围植物的生长发育<sup>[5]</sup>。近年来,随着秸秆还田面积的逐年增加,秸秆腐解产生的化感物质对植物生长的影响已受到重视<sup>[6-7]</sup>。

已有的研究表明,*Bt* 基因所表达的 *Bt* 蛋白可

收稿日期:2011-03-02

基金项目:转基因生物新品种培育重大专项(2011ZX08011-003);博士科研创新专项(kycx2010020)

第一作者:陈小文,博士研究生, E-mail:yucan@163.com

通讯作者:董学会,副教授,博士,主要从事器官发育与次生代谢的调控研究, E-mail:xuehuidong@cau.edu.cn

以通过多种途径在环境中释放和积累,其中植物残体降解是主要方式,这可能导致潜在的生态风险<sup>[8-10]</sup>。随着作物秸秆还田技术的大面积推广,为 *Bt* 蛋白流入土壤提供了有利条件<sup>[11-12]</sup>。转 *Bt* 基因玉米是目前全球商品化速度较快的转抗虫基因作物之一<sup>[13]</sup>,我国也有部分转 *Bt* 基因玉米的研究进入中间试验环节阶段,但对于转 *Bt* 基因玉米秸秆还田对环境的安全性影响仍主要集中在土壤生态方面<sup>[14-16]</sup>,对转 *Bt* 基因玉米秸秆还田对后茬作物的影响研究相对不足。

本研究以转 *Bt* 基因玉米秸秆与其受体(非转基因)郑 58 秸秆为材料,在室内考察秸秆浸提液对小麦萌发及幼苗生长的影响,同时用 *Bt* 蛋白溶液浸种,考察了 *Bt* 蛋白对小麦种子萌发的影响,探讨了转 *Bt* 基因玉米秸秆还田外源蛋白的释放对后茬作物萌发的影响,以期对转 *Bt* 基因玉米的合理利用提供理论依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 供试材料

本试验所用秸秆为本实验室 2010 年在上庄试验站种植的转 *Bt* 基因玉米秸秆及亲本受体郑 58 的秸秆;小麦种子为多抗一号,购于中国农业科学院。

### 1.2 试剂及仪器

*Bt* 蛋白标准品、Envirologix 转基因快速检测试纸及 Envirologix 转基因 ELISA 试剂盒均购于上海佑隆生物技术有限公司。

仪器有杯式粉碎机(FW100)、全温振荡培养箱(HZQ-F160)、酶标仪(Thermo Electron Corporation Multiskan MK3)、人工气候箱(MGC-350HP-2)。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 秸秆浸提液的提取

选取转 *Bt* 基因玉米秸秆及其受体品种郑 58 玉米秸秆分别用杯式粉碎机粉碎,然后各称取 0.5、1.0 和 2.0 g 秸秆粉末置于 100 mL 三角瓶中,每瓶加入蒸馏水 50 mL,用封口膜将瓶口封好。将三角瓶置于摇床上于 25 ℃,100 r/min 条件下提取。提取 24 h 后,将三角瓶中混合液转入 50 mL 离心管中,室温下 4 000 r/min 离心 10 min,取上清,即为秸秆浸提液。

#### 1.3.2 浸提液处理小麦萌发

挑选整齐一致的小麦种子,用 1% 的 NaClO 消毒 10 min,蒸馏水漂洗 3~5 遍,然后将种子置于滤纸上以去除表面过多水分。试验以浸提液作为种子萌发的水分来源,按浸提液种类设 7 个处理(蒸馏水作为对照),每个处理取种子 50 粒,均匀置于内含浸提液浸润发芽纸的塑料盒(长×宽×高为 12 cm×12 cm×5 cm)中,并放入人工气候箱中培养,培养温度为 25 ℃恒温,12 h/12 h 光暗交替,定时观察种子萌发情况,并及时添加相应的提取液以保证湿度。每个处理 3 次重复。

培养 3 d 开始记录小麦种子萌发情况,第 6 天发芽结束,统计发芽数,计算种子活力指标(发芽率、发芽势、发芽指数和活力指数),以比较种子活力高低。每个处理选取 10 株整齐一致的幼苗进行株高、根长及根数的测定,同时测定 10 株幼苗的干鲜重。种子活力指标<sup>[17]</sup>计算如下:

$$\text{发芽率}/\% = \frac{\text{发芽的种子数}}{\text{供试种子数}} \times 100$$

$$\text{发芽势}/\% = \frac{\text{规定时间内发芽的种子数}}{\text{供试种子数}} \times 100$$

$$\text{发芽指数 } I_G = \sum(G_i/D_i)$$

$$\text{活力指数 } I_V = I_G \times S$$

式中: $G_i$  为每天发芽数; $D_i$  为与  $G_i$  对应的天数; $S$  为种苗单株鲜重。

#### 1.3.3 浸提液 *Bt* 蛋白的测定

*Bt* 蛋白的定性检测:采用 Envirologix 转基因快速检测试纸测定。具体方法为取秸秆浸提液各 400  $\mu$ L,分别装入 1.5 mL 离心管中,按试纸条使用说明进行检测,10 min 后观测结果,若试纸条上出现 2 条红色条带,说明含有检测蛋白,只有 1 条带则没有检测蛋白。

*Bt* 蛋白的定量检测:选用 Envirologix 转基因 ELISA 试剂盒进行定量检测目的蛋白的含量。

#### 1.3.4 不同质量浓度 *Bt* 蛋白对小麦种子处理

挑选整齐一致的小麦种子,消毒后用不同质量浓度(0、0.05、0.50、1.00、5.00 和 10.00 ng/mL)的 *Bt* 蛋白溶液浸种 24 h,然后放入发芽盒中进行萌发试验,以浸种液作为发芽过程中水分来源。其余方法及条件同 1.3.2。

## 1.4 数据处理

数据整理采用 Excel 2007。方差分析和差异显著性检验采用 DPS 数据处理系统。多重比较采用 Duncan 法,显著水平设为  $P < 0.05$ 。

## 2 结果与分析

### 2.1 秸秆浸提液对小麦萌发的影响

不同秸秆浸提液对小麦活力指标的影响见表 1。当秸秆浸提质量体积比为 1:100 时,各项活力指标与对照差异不明显;当秸秆浸提质量体积比增

加时,各项活力指标随之呈下降趋势。当郑 58 和转基因秸秆与水的比例为 1:25 时,发芽率分别为 68% 和 70%,发芽势为 22.0% 和 23.3%,发芽指数仅为 8.68 和 9.07,活力指数则为 0.94 与 1.28,均低于其他各处理,且与对照(发芽率 84%,发芽势 46.7%,发芽指数和活力指数分别为 11.86 与 1.64)相比有明显差异,并达到显著水平,说明高比例秸秆浸提液处理后的小麦各项活力指标均受到明显抑制,以非转基因秸秆浸提液处理的更为明显。

表 1 不同秸秆浸提液对小麦活力的影响

Table 1 Effect of different straw aqueous extracts on seed germination of wheat

处 理	发芽率/%	发芽势/%	发芽指数	活力指数
CK	84±4 ab	46.7±2.3 a	11.86±0.52 a	1.64±0.35 a
郑 <sub>25</sub>	68±4 b	22.0±4.0 c	8.68±0.57 c	0.94±0.04 b
郑 <sub>50</sub>	75±9 ab	30.0±7.2 bc	9.83±1.25 bc	1.40±0.11 ab
郑 <sub>100</sub>	82±2 ab	42.7±2.3 a	11.37±0.09 ab	1.54±0.21 a
转 <sub>25</sub>	70±9 b	23.3±1.2 c	9.07±1.03 c	1.28±0.15 ab
转 <sub>50</sub>	80±5 ab	40.7±3.1 ab	11.10±0.24 ab	1.45±0.17 ab
转 <sub>100</sub>	89±3 a	46.0±5.3 a	12.28±0.54 a	1.60±0.05 a

注:同列数字后不同小写字母表示在 0.05 水平上差异显著。各处理中郑代表郑 58,转代表转基因,数字表示秸秆的浸提比例。下表同。

不同处理对幼苗形态的影响如表 2 所示。各处理对幼苗的鲜重影响差异不明显,但郑 58(1:25)时,干重明显降低,与其他处理形成显著差异。转基因(1:100)促进植株形态发育的效果最好,株高和根长分别达到 9.70 和 10.84 cm,显著高于对照,而

郑 58(1:25)抑制植株生长,株高和根长分别为 6.90 和 4.28 cm,与其他各处理形成显著差异,但该处理显著增加了幼苗的根数,幼苗平均根数达到 5.5 条,较低浓度转基因秸秆浸提液处理的幼苗根数增加 0.5 条。

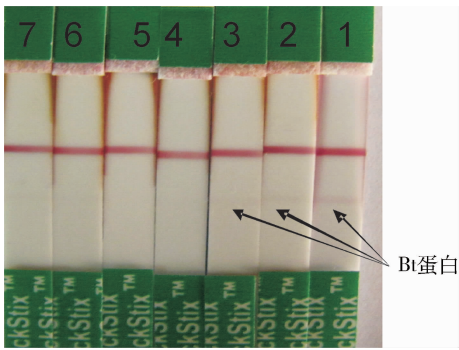
表 2 不同秸秆浸提液对小麦形态的影响

Table 2 Effect of different straw aqueous extracts on wheat seedling morphology

处 理	鲜重/g	干重/g	含水率/%	株高/cm	根长/cm	根数
CK	1.38±0.28	0.16±0.01 a	87.9±2.5	9.0±0.4 b	9.57±0.95 b	5.3±0.6 ab
郑 <sub>25</sub>	1.08±0.02	0.13±0.00 b	87.9±0.2	6.9±0.7 c	4.28±0.69 d	5.5±0.8 a
郑 <sub>50</sub>	1.43±0.08	0.16±0.01 a	88.8±0.9	9.3±0.5 ab	8.68±1.04 c	5.2±0.8 ab
郑 <sub>100</sub>	1.35±0.18	0.16±0.01 a	88.0±1.1	9.0±0.6 b	9.69±1.07 b	5.1±0.7 ab
转 <sub>25</sub>	1.41±0.02	0.16±0.01 a	88.4±0.5	9.0±0.5 b	9.67±0.94 b	5.6±0.6 a
转 <sub>50</sub>	1.31±0.16	0.16±0.01 a	87.6±1.1	9.3±0.5 b	9.72±1.22 b	4.9±0.8 b
转 <sub>100</sub>	1.30±0.05	0.17±0.01 a	87.1±0.0	9.7±0.5 a	10.84±0.97 a	5.0±0.7 b

## 2.2 秸秆浸提液中 Bt 蛋白的测定

不同浸提液中 Bt 蛋白检测结果如图 1。所有



1 为阳性对照; 2 为转基因秸秆(1:25); 3 为转基因秸秆(1:50); 4 为转基因秸秆(1:100); 5 为非转基因秸秆(1:25); 6 为非转基因秸秆(1:50); 7 为非转基因秸秆(1:100)。括号中数字表示秸秆与提取液的质量体积比。

图 1 不同秸秆浸提液 Bt 蛋白定性检测

Fig. 1 Qualitative test of Bt protein in different straw aqueous extracts

非转基因秸秆浸提液中均未检测到 Bt 蛋白,转基因秸秆浸提液也只在质量体积比达到一定比例时方检测出 Bt 蛋白。如浸提比例为 1:25 和 1:50 条件下,能检测到 Bt 蛋白的存在,而比例为 1:100 时未检测出 Bt 蛋白。

对检测出 Bt 蛋白的 2 组浸提液中 Bt 蛋白浓度进行测定,结果显示浸提比例为 1:25 和 1:50 的浸提液中 Bt 蛋白质量浓度分别为  $(3.4 \pm 0.2)$  和  $(1.7 \pm 0.2)$  ng/mL。

## 2.3 不同浓度 Bt 蛋白对小麦萌发的影响

不同 Bt 蛋白溶液浸种结果(表 3)显示,Bt 蛋白浸种一定程度上促进了种子的萌发,各处理的发芽率较对照均有所提高,株高及根数上也略高于对照,除 10 ng/mL Bt 浸种后幼苗株高显著高于对照及其他处理,各处理对小麦的发芽率、株高、根长及根数上的影响并不明显,差异未达到显著水平。

表 3 不同浓度 Bt 蛋白对小麦萌发的影响

Table 3 Effect of Bt protein with different concentration on seed germination of wheat

处理浓度/(ng/mL)	发芽率/%	株高/cm	根长/cm	根数
0	$81.3 \pm 11.7$	$6.41 \pm 0.40$ b	$8.6 \pm 1.1$	$4.6 \pm 0.8$
0.05	$84.7 \pm 4.1$	$6.57 \pm 0.37$ b	$8.9 \pm 1.1$	$4.7 \pm 0.9$
0.50	$82.0 \pm 3.5$	$6.59 \pm 0.41$ b	$8.3 \pm 1.1$	$4.9 \pm 0.8$
1.00	$81.3 \pm 4.2$	$6.59 \pm 0.39$ b	$8.6 \pm 1.1$	$4.9 \pm 0.8$
5.00	$85.3 \pm 1.2$	$6.59 \pm 0.40$ b	$8.9 \pm 0.8$	$4.8 \pm 0.6$
10.00	$89.3 \pm 6.1$	$6.89 \pm 0.32$ a	$9.0 \pm 1.0$	$4.7 \pm 1.0$

## 3 讨论

秸秆还田改善土壤理化性质的同时,其残体也会对后茬作物产生影响。马永良等<sup>[18]</sup>的试验测定结果表明玉米秸秆还田能够促进后茬小麦的生长,提高小麦产量。然而 Rizvi 等<sup>[19]</sup>报道不同浓度的小麦秸秆提取液对燕麦存在不同的化感效应,高茂盛等<sup>[20]</sup>也报道了秸秆还田量过高能导致接茬作物产量的下降。本试验结果表明,秸秆浸提液的质量体积比大小对小麦种子的萌发存在不同的作用效果:低浓度秸秆浸提液对小麦萌发的处理效应与对照差异不显著;高浓度的秸秆浸提液(1:25)明显降低小麦的发芽率、发芽势、发芽指数和活力指数,使有生活力的种子数量明显减少,影响了种子的萌发,间接

影响了田间的出苗,同时降低了植株的株高和根系的伸长,从而可能影响到后期的产量。

转 *Bt* 基因作物秸秆残体可以向土壤中释放 Bt 蛋白,且是土壤中 Bt 蛋白积累的主要途径之一。在对转基因玉米秸秆浸提液 Bt 蛋白进行检测时发现转 *Bt* 基因玉米秸秆能释放出 Bt 蛋白,且随着浸提液质量体积比的增加,Bt 蛋白得以积累,含量随之增加,当浸提液浓度为 1:25 时,Bt 蛋白含量可以达到 3.4 ng/mL。但不同浓度 Bt 蛋白溶液对小麦进行浸种处理对种子的萌发和幼苗的影响并无显著差异,说明 Bt 蛋白的存在不是造成差异的原因。

已有的研究表明,转 *Bt* 基因抗虫棉秸秆不会增加土壤中毒素的含量,非转基因棉秸秆处理的土壤毒素相对略强,不同棉秸秆处理间萝卜的发芽率及

幼苗生长的差异性不显著<sup>[21]</sup>。本试验中不同秸秆类型浸提液对小麦萌发及幼苗的生长发育作用效应表现结果一致,尤其以非转基因秸秆处理效果更为明显,再次说明 Bt 蛋白不是影响小麦萌发和幼苗生长发育的主要因素,说明差异的产生是秸秆中释放的其他化学物质影响了小麦的萌发及幼苗生长。

作物秸秆可以向环境中释放一些化学物质,如生物碱、脂肪酸、萜类、异黄酮类、糖类 etc 次生代谢物质影响其他作物的生长发育<sup>[22-23]</sup>。但目前对于秸秆化感的作用机制还不十分明确,仍需要进一步的探讨。

本试验仅在实验室条件下对转 Bt 基因玉米秸秆浸提液对小麦的萌发及幼苗形态的影响做了研究,而 Bt 蛋白在土壤中的积累是一个长期的、复杂的过程,在整个过程中转 Bt 基因玉米秸秆对小麦种子萌发的影响如何,还需要进行全面深入的研究。

## 参 考 文 献

- [1] 韩永俊,尹大庆,赵艳忠. 秸秆还田的研究现状[J]. 农机化研究,2003(2):45-46
- [2] 刘巽浩,王爱玲,高旺盛. 实行作物秸秆还田 促进农业可持续发展[J]. 作物杂志,1998(5):1-5
- [3] 王璞,赵玉琴. 浸提条件对小麦秸秆中化感物质检测结果的影响[J]. 植物学通报,2001,18(6):735-738
- [4] Shen Qirong, Xu Shouning, Shi Ruihe. Effect of incorporation of wheat straw and urea into soil on biomass nitrogen and nitrogen-supplying characteristics of paddy soil [J]. Pedosphere,1993,3(3):201-205
- [5] Rice E L. Allelopathy [M]. 2 ed. Orlando: Academic Press, 1984:1-50
- [6] 邵庆勤,何克勤,张伟. 小麦秸秆浸提物的化感作用研究[J]. 种子,2007,26(4):11-13
- [7] Ozhan Boz. Allelopathic effects of wheat and rye straw on some weeds and crops[J]. Asian Journal of Plant Sciences,2003,2(10):772-778
- [8] Jepson P C, Croft B A, Prate G E. Test systems to determine the ecological risks posed by toxin release from *Bacillus thuringiensis* genes in crop plants[J]. Molecular Ecology, 1994,3:81-89
- [9] 张丽莉,张玉兰,武志杰,等. 种植转 Bt 基因水稻对土壤酶活性的影响[J]. 应用生态学报,2003,14(12):2261-2264
- [10] 孙彩霞,陈利军,武志杰. Bt 毒素在转基因棉花与土壤系统中的分布[J]. 应用生态学报,2005,16(9):1765-1768
- [11] Tapp H, Stotzky G. Persistence of insecticidal toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* in soil [J]. Soil Biol Biochem,1998,30(4):471-476
- [12] 白耀宇,蒋明星,程家安,等. 转 Bt 基因作物 Bt 毒蛋白在土壤中的安全性研究[J]. 应用生态学报,2003,14(11):2062-2066
- [13] 王建武,冯远娇. Bt 玉米秸秆 Bt 蛋白的土壤降解及其拟合模型的比较[J]. 生态学杂志,2005,24(9):1063-1067
- [14] Saxena D, Stotzky G. Insecticidal toxin from *Bacillus thuringiensis* is released from roots of transgenic Bt corn *in vitro* and *in situ* [J]. FEMS Microbiol Ecol,2000,33:35-39
- [15] Zangerl A R, Mckenna D, Wrmisht C L, et al. Effects of exposure to event 176 *Bacillus thuringiensis* coin pollen on monarch and black swallowtail caterpillars underfield conditions[J]. Proc Natl Acad Sci USA,2001,98:11908-11912
- [16] 韩兰芝,白树雄,赵建周,等. 转基因抗虫棉花和玉米与节肢动物相关的生态安全性研究进展[J]. 昆虫学报,2007,50(7):727-736
- [17] 高灿伦. 作物种子实验技术[M]. 郑州:河南科学技术出版社,1990:54-56
- [18] 马永良,师宏奎,张书奎,等. 玉米秸秆整株全量还田土壤理化性状的变化及其对后茬小麦生长的影响[J]. 中国农业大学学报,2003,8(增刊):42-46
- [19] Rizvi S J H, Rizvi V, Tahir M, et al. Genetic variation in allelopathic activity of wheat genotype[J]. Wheat Information Service,2000,91:25-29
- [20] 高茂盛. 秸秆还田对隔茬冬小麦抗性生理及土壤肥力的影响[D]. 杨凌:西北农林科技大学,2007
- [21] 兰刘芳,易润华. 转 Bt 基因棉花秸秆对土壤多酚氧化酶、纤维素酶活性和毒素的影响[J]. 广西农业科学,2008,39(1):33-36
- [22] Grusy R. County extension agent for agriculture/natural resources[J]. College of Agriculture, University of Kentucky Bull Scout,2003:1-9
- [23] Oussama Oueslati. Allelopathy in two durum, wheat (*Triticum durum* L.) varieties [J]. Agriculture Ecosystems and Environment,2003,96:161-163

(责任编辑:袁文业)