

氮肥对抗虫棉 Bt 蛋白表达的影响及其氮代谢机理的研究

杨长琴, 徐立华*, 杨德银

(江苏省农业科学院经济作物研究所, 南京 210014)

摘要: 通过对抗虫棉抗 310 不同氮肥水平 Bt 蛋白表达的影响研究表明, 施肥能明显促进叶片 Bt 蛋白的表达, 表达量以高氮 > 适氮 > CK。在盛铃期棉叶中 Bt 蛋白含量降低, 但下降幅度则以 CK > 适氮 > 高氮。氮代谢生理研究进一步表明, 抗 310 的游离氨基酸、可溶性蛋白质和全氮含量都明显高于其轮回亲本, 氮肥施用促进了 Bt 棉棉叶在整个大田生育期游离氨基酸的合成和全氮含量的增加、盛花前可溶性蛋白质的合成。相关分析表明, 抗虫棉 Bt 蛋白含量与氮代谢的生理活性密切相关。

关键词: 抗虫棉; Bt 蛋白表达; 氮肥处理; 氮代谢

中图分类号: S562.01 **文献标识码:** A

文章编号: 1002-7807(2005)04-0227-05

Effects of Nitrogen Fertilizer on the Bt-protein Content in Transgenic Cotton and Nitrogen Metabolism Mechanism

YANG Chang-qin, XU Li-hua*, YANG De-yin

(Institute of Industrial Crops, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China)

Abstract: There have been considerable studies on the dynamics of Bt insecticidal protein, but influence of cultural practices on insecticidal protein still remains unreported. The expression of insecticidal protein is influenced not only by genetic factors, but also by its growth, chemical control and the environmental factors. In this experiment, taking nitrogen fertilizer as the test factor, the objectives of the research reported here were: 1) to characterize the expression of insecticidal protein in Bt cotton (Kang 310) at different nitrogen fertilizer rates; 2) taking the conventional cotton (Simian 3) as control, to investigate the nitrogen metabolism of two cultivars at different nitrogen fertilizer rates and examine relationship between the toxin level of Bt transgenic cotton and nitrogen metabolism at different nitrogen rates. The experiment was carried out in 2004 in the field of Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Jiangsu, China. The treatments were different at the amount of nitrogen fertilizer used: high nitrogen fertilizer rate ($375 \text{ kg} \cdot \text{hm}^{-2}$), medium nitrogen fertilizer rate ($225 \text{ kg} \cdot \text{hm}^{-2}$) and CK ($0 \text{ kg} \cdot \text{hm}^{-2}$). The Bt transgenic cotton (Kang 310) and its recurrent parent (Simian 3) were used as the experimental materials. Seedlings were raised in green house sowed on April 13, and transplanted on May 18. We conducted the experiment in a split plot design with three replications and arranged two varieties as main plots and the different nitrogen fertilizer treatments as sub-plot. The proportion of nitrogen fertilizer application was 3 : 2.5 : 4.5 before transplanting, at early flowering stage and early boll developing stage, respectively. Other management practice was the same as common high-yield cotton fields.

The leaf samples were collected from the fourth leaf of the main stems downward from square to

收稿日期: 2005-03-20

作者简介: 杨长琴(1972-), 女, 硕士; * 通讯作者, Jaasxhl@jaas.ac.cn

基金项目: 江苏省自然科学基金项目(BK2003115)

peak boll period. Approximately 6 g fresh leaves were used for the measurement of free amino acid content, soluble protein content and nitrate reductase activity, the remaining leaf samples oven-dried at 70°C until constant weight for determination of total nitrogen content. About 1 g fresh leaves frozen with liquid nitrogen were used for assay of Bt insecticidal protein.

The results showed that the nitrogen fertilizer application can promote the expression of insecticidal protein in leaves of Bt transgenic cotton and the content of Bt-protein is high nitrogen > medium nitrogen > CK. At the full-bolling stage, the reduction of the insecticidal protein content for the medium nitrogen treatment was the less than that of CK, the reduction of Bt-protein content for the high nitrogen treatment was the smallest among the three treatments. The free amino acids content, soluble protein content and total nitrogen content of Bt transgenic cotton were higher than that of the recurrent parent. Nitrogen application promote the synthesis of free amino acids and total nitrogen in all growth stages as well as soluble protein before full-blooming period. Further studies indicated the content of insecticidal protein was closely positively correlated with the physiological activities of nitrogen metabolism.

The soluble protein content, amino acids content and nitrate reductase activity of high nitrogen treatment and medium nitrogen treatment descend magnificently at flowering stage (7/14). It isn't believed to be beneficial to the expression of Bt insecticidal protein. Therefore, we should increase nitrogen fertilizer application at the flower and boll period in Bt transgenic cotton to promote the expression of Bt-protein effectively.

Key words: Bt transgenic cotton; expressing of Bt-protein; nitrogen application; nitrogen metabolism

前人对转基因抗虫棉 Bt 蛋白表达动态做了大量的研究,一致认为抗虫棉 Bt 蛋白表达具有时空动态特征^[1-2],而抗虫棉 Bt 蛋白的表达除了受自身遗传特点的影响,还与内部生长发育和调控及环境条件等有关。因而寻求抗虫棉 Bt 蛋白稳定表达的调节途径和栽培措施具有十分重要的意义。目前就环境因子如温度、水分对 Bt 蛋白表达的影响作了一定的研究^[3-4],至于栽培措施如肥料如何影响 Bt 蛋白的表达则未见报道。氮素是棉花生育进程中最活跃的营养元素,也是转 Bt 基因棉 Bt 蛋白的主要构成物质。本文以氮肥为试验因子,研究不同施氮水平对抗虫棉抗性表达的影响及其氮代谢影响的机理,从而为栽培上如何调节抗虫棉抗性稳定表达提供一定的生理基础以及调节途径。

1 材料和方法

试验于 2004 年在江苏省农科院经济作物研究所试验地进行,供试材料为抗 310,轮回亲本泗棉 3 号(泗 3)为对照,设置不同氮肥水平,分别为高氮(375 kg·hm⁻²)、适氮(225 kg·hm⁻²)及 CK(0 kg·hm⁻²)处理,试验以裂区设计,氮肥为主区,品种为副区,重复 3 次,共计 18 个小区。试验

地土壤肥力中等,于 4 月 13 日播种,5 月 18 日移栽。其管理措施同一般高产田。于现蕾期(6 月 16 日)至盛铃期(8 月 26 日),取棉花功能叶片倒 4 叶(打顶后取倒 2 叶)室内测定 Bt 蛋白、游离氨基酸、可溶性蛋白质、硝酸还原酶(NR)活性和全氮含量。

Bt 蛋白的测定采用酶联免疫法^[5]。可溶性蛋白质的测定运用考马斯亮蓝法,游离氨基酸的测定运用茚三酮比色法^[6],NR 活性的测定采用磺胺比色法^[7],全氮含量的测定应用凯氏定氮法^[8]。

2 结果与分析

2.1 不同氮肥水平处理对抗 310 棉叶 Bt 蛋白表达的影响

在不同氮肥水平处理下,棉叶 Bt 蛋白表达量随着生育进程都呈下降趋势,但不同处理从 6 月 16 日(盛蕾期)至 8 月 26 日(吐絮期)Bt 蛋白表达量下降的程度不同,高氮、适氮和 CK 处理分别为 28.1%、30.8%、37.9%,即 CK 处理 Bt 蛋白含量下降幅度最大,高氮处理最小(表 1)。此外,与 CK 处理相比,Bt 蛋白表达量表现为随着施氮水平增加而上升,如 6 月 16 日,高氮、适氮和 CK 处

理的 Bt 蛋白含量(鲜重,下同)分别为 638.4、586.2 和 454.1 $\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$,其差异达到 0.05 以上显著水平。而且高氮与适氮处理相比,除盛铃期(8

月 12 日)外,又以高氮处理显著高于适氮处理。说明施氮显著影响抗虫棉棉叶中 Bt 蛋白的表达。

表 1 不同氮肥水平处理抗虫棉 Bt 蛋白含量(鲜重)

处理	06-16	06-30	07-14	07-28	08-12	08-26
高氮	638.4 a A	626.2 a A	563.6 a A	507.9 a A	481.9 a A	459.3 a A
适氮	586.2 b A	561.9 b B	494.1 b B	462.8 b B	447.1 aAB	405.4 b B
CK	454.1 c B	415.8 c C	393.2 c C	368.9 c C	372.3 b B	281.9 c C

注:表中 a、b、c 表示各处理间的差异显著水平(LSD=0.05); A、B、C 表示各处理间的差异显著水平(LSD=0.01)。

2.2 不同氮肥水平处理对氮代谢生理活性的影响

2.2.1 不同氮肥水平处理对棉叶游离氨基酸含量的影响。

表 2 可见,抗虫棉及轮回亲本棉叶游离氨基酸含量随着生育进程基本上都呈下降趋势。抗虫棉与轮回亲本相比,在相同处理条件下,全生育期都以抗虫棉棉叶中游离氨基酸含量显著高于轮回亲本,如抗虫棉在蕾末初花期(6 月 30 日),高氮、适氮和 CK 处理的游离氨基酸含量(鲜重,下同)分别为 495.0、449.4 和 354.6

$\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$,而泗棉 3 号分别为 365.0、324.9、303.5 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 。此外,同一品种内不同氮肥水平处理间叶片中游离氨基酸含量随着氮肥用量的增加而增加,增施氮肥更有利于游离氨基酸的合成。表 2 还表明,盛铃期(8 月 12 日)前抗虫棉的不同氮肥水平处理间棉叶游离氨基酸含量差异都达极显著水平,而轮回亲本泗棉 3 号在盛花期(7 月 28 日)前各处理间差异较大,但盛花期后差异较小甚至不显著。可见,抗虫棉棉叶中氨基酸合成对氮肥更敏感。

表 2 不同氮肥水平处理棉叶游离氨基酸含量(鲜重)的变化

品种	处理	05-19	06-16	06-30	07-14	07-28	08-12	08-26
抗 310	高氮		573.7 a A	495.0 a A	347.7 a A	337.3 a A	387.9 a A	321.3 a A
	适氮	647.1 a A	467.9 b B	449.4 b B	282.0 b B	271.7 b B	352.6 b B	314.8 a AB
	CK		413.9 cd CD	354.6 c C	244.0 d C	240.6 c C	318.0 c C	225.2 d D
泗 3	高氮		541.3 a A	365.0 c C	281.3 b B	277.9 b B	305.7 cd C	299.3 b BC
	适氮	593.1 b B	444.2 bc BC	324.9 d D	260.6 c C	214.3 d D	295.8 d C	282.6 c C
	CK		394.5 d D	303.5 e E	224.7 e D	223.3 d CD	292.0 d C	221.9 d D

注:表中 a、b、c 表示各处理间的差异显著水平(LSD=0.05); A、B、C 表示各处理间的差异显著水平(LSD=0.01)。

2.2.2 不同氮肥水平处理对棉叶可溶性蛋白质含量的影响。

表 3 表明,在相同氮肥水平处理下抗虫棉与轮回亲本相比,棉叶可溶性蛋白质含量显著提高。同一品种在不同氮肥水平处理间,可溶性蛋白质含量在开花期(7 月 14 日)前均表现为随施氮量的增加而增加,且差异达到显著以上水平,其中 CK 处理整个生育期可溶性蛋白质含量极低,如 6 月 30 日,抗 310 CK 处理的可溶性蛋白质含量为 5.78 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$,仅为适氮和高氮处理的 22.4%、33.2%;轮回亲本泗棉 3 号的 CK 处

理可溶性蛋白质含量为 3.52 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$,为适氮和高氮处理的 20.1%、25.8%,说明了施氮肥显著影响棉叶可溶性蛋白质的合成。此外,表 3 还表明,抗虫棉及轮回亲本在施氮条件下,开花前(7 月 14 日前)和结铃盛期(8 月 12—26 日)可溶性蛋白质含量都较高,而 CK 处理在此阶段反而较低,这说明了 CK 处理氮素营养不足影响叶片可溶性蛋白质合成,进而影响生长前期叶片的生理活性和功能,生长后期叶片的寿命。

表3 不同氮肥水平处理棉叶可溶性蛋白质含量的变化

Table 3 Effects of different nitrogen fertilizer rates on soluble protein content

mg · g⁻¹

		05-19	06-16	06-30	07-14	07-28	08-12	08-26
抗 310	高氮	27.21 a A	25.81 a A	20.67 a A	9.58 a A	4.90 b B	4.88 d D	6.64 a A
	适氮		17.4 d D	15.7 b B	7.19 b B	4.89 b B	6.25 b B	7.05 a A
	CK		5.78 e E	3.90 e E	4.67 c C	6.20 a A	5.79 c C	2.48 c C
泗 3	高氮	24.20 b B	17.5 b B	12.25 c C	4.81 c C	4.23 d C	3.23 e E	6.68 a A
	适氮		13.65 c C	8.13 d D	4.13 d D	3.96 e C	2.93 f E	4.10 b B
	CK		3.52 f F	3.02 f F	3.87 d D	4.62 c B	6.62 a A	2.56 c C

注:表中 a,b,c 表示各处理间的差异显著水平(LSD=0.05); A,B,C 表示各处理间的差异显著水平(LSD=0.01)。

2.2.3 不同氮肥水平处理对棉叶 NR 活性的变化。图 1 表明,抗虫棉及其轮回亲本的 NR 活性在不同氮肥水平处理下表现不同,两个品种在不施氮条件下酶活性都表现为盛花(7月28日)前较低,而盛花后相对较高,显然氮肥不足影响棉花生育前期氮素的同化;在高氮和适氮处理条件下,两个品种都以高氮处理的 NR 活性较高,但与棉叶游离氨基酸含量、可溶性蛋白质含量等相比,在相同处理条件下抗虫棉与轮回亲本间 NR 活性差异未表现出明显的规律性。

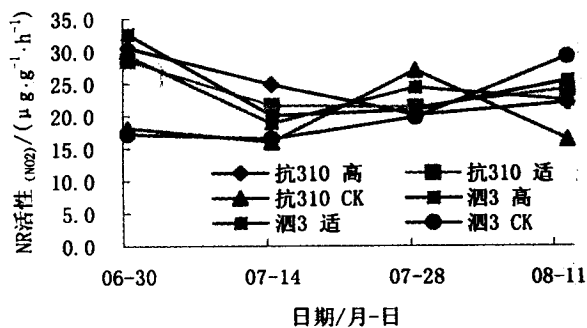


图 1 不同氮肥水平处理对棉叶 NR 活性的影响

Fig. 1 Effects of different nitrogen fertilizer rates on nitrate reductase activity

2.2.4 不同氮肥水平处理对棉叶全氮含量的影响。图 2 表明,抗虫棉及轮回亲本在不同氮肥水平处理下,都表现为在盛蕾期(6月16日)叶片全氮含量最高,以后随着生育进程基本呈下降趋势。在高氮和适氮处理下,抗虫棉棉叶全氮含量高于其轮回亲本。在 CK 处理下,抗虫棉与亲本间叶片全氮含量差异较小。不同处理间相比,抗虫棉高氮和适氮处理棉叶全氮含量明显高于 CK 处理,而且高氮处理全氮含量与 CK 处理差异更大。如 6 月 30 日测定,抗虫棉 CK 处理的全氮含量为 3.44%,高氮、适氮处理比 CK 处理分别增加

54.36%、27.32%,可见,氮肥用量明显影响抗虫棉的全氮含量。轮回亲本的高氮和适氮处理与 CK 处理间全氮含量差异明显,但在高氮和适氮处理间差异不明显,如 6 月 30 日,CK 处理的全氮含量为 3.42%,高氮、适氮处理比 CK 处理分别增加 30.4%、33.91%,这说明了泗棉 3 号在施氮 225~375 kg · hm⁻² 范围内棉叶全氮含量变化不大,表现为较耐肥。

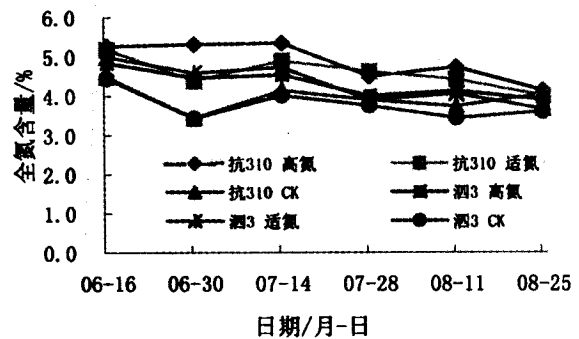


图 2 不同氮肥水平处理对棉叶全氮含量的影响

Fig. 2 Effects of different nitrogen fertilizer rates on total nitrate reductase content

2.3 抗虫棉 Bt 蛋白表达与棉叶氮代谢生理活性的相关分析

相关分析表明,抗虫棉不同氮肥水平处理的 Bt 蛋白含量与棉叶氮代谢的相关化合物及酶活性呈密切相关,棉叶 Bt 蛋白表达量与可溶性蛋白、游离氨基酸及全氮含量呈极显著正相关关系,相关系数分别为 0.7993**、0.8371** 和 0.8303**,与 NR 活性呈显著正相关($r = 0.6647^*$),可见棉株氮素代谢影响抗虫棉抗性的表达。

3 讨论

3.1 施氮促进了抗虫棉 Bt 蛋白的合成,有利于

抗虫性保持稳定

研究结果表明,叶片中 Bt 蛋白的含量随着生育进程的推进而呈下降的趋势,这与前人对抗虫棉抗性研究结果一致。本研究进一步表明,与不施氮肥处理(CK)相比,施氮肥能促进棉叶中 Bt 蛋白的表达,而且氮肥多的,Bt 蛋白含量也高,表明施氮肥能够促进 Bt 蛋白的表达,有利于结铃期抗虫性的增强。

3.2 氮肥施用使氮代谢增强,从而有利于 Bt 蛋白的表达

研究还表明,抗虫棉和轮回亲本相比,游离氨基酸、可溶性蛋白质及全氮含量明显提高,而且施氮处理棉叶的游离氨基酸含量、可溶性蛋白含量、全氮含量显著高于不施氮处理,施氮越多,其含量也越高。轮回亲本在盛花后施氮处理间游离氨基酸含量、全氮含量相差不大,说明抗虫棉对氮肥反应更敏感。因而氮肥能更有效调节抗虫棉氮素代谢,进而调控抗虫棉 Bt 蛋白的表达。

3.3 加强抗虫棉花铃期氮肥应用,有利于 Bt 棉抗虫蛋白的表达

肥料是当前棉花栽培中促进棉株生长和发育的一个重要的调节手段,对转 Bt 基因抗虫棉而言,氮素既是核酸和蛋白质等生命物质的组成部分,又是杀虫晶体蛋白的主要构成物质。施氮量直接影响棉株根系对氮素养分的吸收,进而影响棉株体内氮素生理代谢。氮肥的投入是一个可以调节的栽培措施,本文结果中高氮和适氮处理在

开花期(7月14日)棉叶可溶性蛋白质含量、游离氨基酸含量以及 NR 活性都出现较大幅度下降,这不利于 Bt 蛋白的表达。因此应加强转 Bt 基因棉田开花期氮肥的调节,保证转 Bt 棉 Bt 蛋白的有效表达。

参考文献:

- [1] 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.
- [2] 陈松,吴敬音,周宝良,等. 转 Bt 基因棉 Bt 蛋白表达量的时空变化[J]. 棉花学报,2000,12(4):189-193.
- [3] 王家宝,王留明,沈法富,等. 渍涝与干旱对不同 Bt 基因抗虫棉的影响[J]. 棉花学报,2001,13(2):87-90.
- [4] 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.
- [5] 王保民,何钟佩,赵继勋. 抗虫棉 Bt 晶体蛋白免疫检测方法的研究[J]. 棉花学报,1998,10(4):220-221.
- [6] 张宪政. 作物生理研究法[M]. 北京:农业出版社,1992. 144-162.
- [7] 白宝璋,王景安. 植物生理生化测试技术[M]. 北京:中国农业出版社,1995. 23-25.
- [8] 南京农业大学. 土壤农化分析[M]. 北京:农业出版社,1994. 214-236. ●