

Bt 棉不同种植年限土壤中 Bt 基因及其蛋白的残留测定

沈平^{1,2}, 张永军^{1*}, 陈洋¹, 吴孔明¹, 彭于发¹, 郭予元¹

(1. 中国农业科学院植物保护研究所, 植物病虫害生物学国家重点实验室, 北京 100094; 2. 农业部科技发展中心, 北京 100026)

摘要: 从 16 个多年种植 Bt 棉花的田块抽取土壤样本。采用 PCR 和 ELISA 方法测定了土壤试样中 Bt 基因序列片段和杀虫蛋白的残留和累积效应。结果表明, 以土壤总 DNA 为模板不能扩增出棉花内标准基因和 *cry1A* 基因预期大小片段。连续种植 Bt 棉花可以在土壤中低剂量残留 Bt 杀虫蛋白, 但不会导致 Bt 毒蛋白在土壤中累积。

关键词: Bt 棉花; 土壤; Bt 杀虫蛋白; 残留

中图分类号: S435.622 **文献标识码:** A

文章编号: 1002-7807(2008)01-0079-03

Detection for Persistence of Bt Gene and Bt Insecticidal Proteins in Soil after Multiple Years of Bt Cotton Planting

SHEN Ping^{1,2}, ZHANG Yong-jun^{1*}, CHEN Yang¹, WU Kong-ming¹, PENG Yu-fa¹, GUO Yu-yuan¹

(1. State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100094, China; 2. Technology and Development Center of MOA, Beijing 100026, China)

Abstract: Soil samples were collected from within sixteen fields where insect-resistant transgenic cotton encoding the *cry1A* gene had been grown and subsequently incorporated into soil by post-harvest tillage for multiple years. The *cry1A* gene sequence fragments and Bt insecticidal protein in these samples (collected after the last season tillage) were explored using PCR amplification and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method, respectively. Soil total DNA could be gotten in high quality, but we could not get any PCR amplification result of cotton internal standard gene or *cry1A* gene. The results from ELISA indicated that repeated agricultural using of transgenic Bt cotton expressing *Cry1A* insecticidal protein could persist extremely low levels of Bt protein in soil. However, the persistence of Bt protein in soil did not result in accumulation by post-harvest tillage in multiple seasons.

Key words: transgenic Bt cotton; soil; Bt insecticidal protein; persistence

Bt 作物大规模商业化种植过程中, 植株残体、根系分泌物和花粉等不断向土壤系统释放外源 Bt 基因序列片段和杀虫蛋白, 这样可能会使转基因成分在土壤生态系统中富集, 从而影响土壤某些生物种群、功能类群以及土壤生物多样性和土壤生态过程^[1]。为了更好地发挥 Bt 棉花的抗虫优势, 延长其使用寿命, 于 2005 年对 Bt 棉花种

植过程中 Bt 基因序列片段和杀虫蛋白在土壤中的残留与累积进行了检测, 以期为我国转基因抗虫棉花生态安全监管提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 供试棉田土壤样品的采集和前处理

供试棉田分别设在新疆库尔勒普惠农场、新

收稿日期: 2006-12-14

作者简介: 沈平(1966-), 女, 副研究员; * 通讯作者, yjzhang@ippcaas.cn

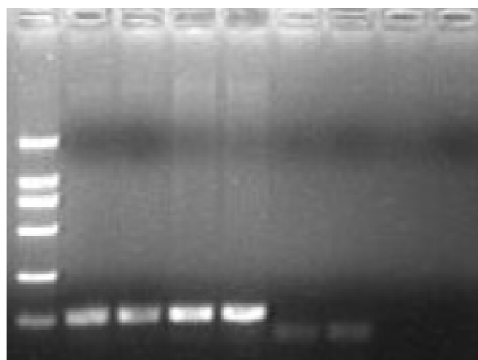
基金项目: 国家重点基础研究发展规划项目(001CB109004)

疆库尔勒包头湖农场、新疆喀什农场、中国农业科学院廊坊中试基地、河南省新乡七里营新植原种场、山东省夏津县农业局实验田、湖北天门市试验基地。在棉花秋季收获后,每个田块5点取样,每点按照30 cm×30 cm规格掘取地表至向下20 cm深处富含棉花根系的土壤,分别装入无菌自封袋,带回室内置于-20℃保存至后续检测。

1.2 *cry1Ac* 基因、*cry1Ab* 基因以及 *cry1Ac* 与 *cry1Ab* 融合基因序列的 PCR 扩增

按照土壤 DNA 分离纯化试剂盒提供的方法提取土壤总 DNA 作为扩增模板^[2]。棉花内标准基因 *Sad1* 上游引物:5'-CCAAAGGAGGTGC-CTGTTCA-3', 下游引物:5'-TTGAGGT-GAGTCAGAATGTTGTTC-3', 扩增产物片段108 bp。*cry1Ac* 基因、*cry1Ab* 基因、以及 *cry1Ac* 与 *cry1Ab* 融合基因(文中均简称 *cry1A* 基因)序列通用上游引物:5'-GAAGGTTTGAG-CAATCTCTAC-3', 下游引物:5'-CGAT-CAGCCTAGTAAGGTCGT-3', 扩增产物片段301 bp。每个样品设3次重复。扩增结束后,反

M 1 2 3 4 5 6 7 8



M 分子量标记(DL2000),1~2 阳性对照,3~4 阴性对照,5~6 空白对照,7~8 土壤样品

图1 棉花内标准基因 *Sad1* PCR 扩增

Fig. 1 PCR amplification of *Sad1*

2.2 土壤中残留 Bt 杀虫蛋白的监测

由表1可以看出,所有种植 Bt 棉花的田块土壤样品中均能够检出 Bt 杀虫蛋白,但含量都低于 $1 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ 。在连续3年(含)以上种植 Bt 棉花的田块土壤试样中,编号16的样品的 Bt 杀虫蛋白含量显著高于其它样品外,编号为1,6,7,8,9和13的试样中 Bt 蛋白的残留量差异不显著。2005年当年种植 Bt 棉,之前种植常规棉的田块土壤样品编号分别为3,5,10,11,14和15的 Bt 蛋白含量差异没有达到显著水平。另外,2005年

应产物经2%琼脂糖电泳分析。

1.3 土壤中 Bt 杀虫蛋白的测定

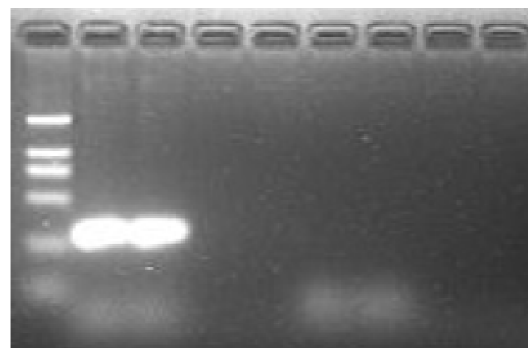
采用美国 EPA 指定的 ENVIROLOGIX 公司 ELISA 定量检测试剂盒(检测极限为 $0.1 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$) 进行检测,每处理重复3次。根据标准曲线求出 Bt 蛋白含量,换算成每克干重 Bt 蛋白含量,用 $\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$ 表示。

2 结果与讨论

2.1 土壤中目标基因的检测

由图1可以发现,阳性对照和阴性对照总 DNA 均能够扩增出内标准基因 *Sad1* 预期大小片段(108 bp),而所有供试土壤样品总 DNA 都不能够扩增出 *Sad1* 预计大小片段。阳性对照总 DNA 能够扩增出 *cry1A* 基因预期大小片段(301 bp),而阴性对照和所有测试的土壤样品总 DNA 均未能够扩增出 *cry1A* 基因预期大小片段(图2)。

M 1 2 3 4 5 6 7 8



M 分子量标记(DL2000),1~2 阳性对照,3~4 阴性对照,5~6 空白对照,7~8 土壤样品

图2 *cry1A* 基因的 PCR 扩增

Fig. 2 PCR amplification of *cry1A*

当年种植常规棉,之前种植 Bt 棉花编号为2和12土壤试样中 Bt 蛋白残留量也没有显著差异。同一省的土壤样品中 Bt 蛋白的残留量差异不显著,如新疆、河南、山东和河北省。但不同省间的土壤样品,如编号为4的样品与编号为6,7,9,10,14,15和16的样品 Bt 蛋白的残留量有一定的差异。可见,连续种植 Bt 棉花可以造成土壤中 Bt 杀虫蛋白低剂量残留,但不会导致 Bt 毒蛋白累积。不同种植区土壤特性的差异可能会导致 Bt 杀虫蛋白残留量有所变化。

表 1 土壤试样 Bt 杀虫蛋白含量
Table 1 Content of Bt insecticidal proteins in soil samples

ng · g⁻¹

样品编号	采样地点	备 注	Bt 杀虫蛋白含量 /(ng · g ⁻¹)
1	新疆库尔勒普惠农场	2005 年种植中棉所 41(GFMcry1A/CpTI 双价基因),1999—2002 年种植高抗 5 号(cry1Ac 基因),2003—2004 年种植 20B(GFMcry1A 基因)	0.49±0.01 abc
2	新疆库尔勒包头湖农场	2005 年种植中棉所 43(常规棉),2002—2004 年种植中棉所 41	0.47 0.09 bc
3	新疆喀什农场	2005 年种植 SGK321(GFMcry1A/CpTI 双价基因),2005 年以前种植常规棉花	0.59 0.15 bc
4	新疆喀什农场	2005 年种植中棉所 35(常规棉),2003—2004 年种植中棉所 41	0.46 0.06 ab
5	河南省新乡七里营新植原种场	2005 年种植新植 1 号(GFMcry1A 基因),2005 年以前种植常规棉花	0.49 0.12 abc
6	河南省新乡七里营新植原种场	2002—2005 年种植高抗 5 号	0.40 0.02 c
7	河南省新乡七里营新植原种场	2000-2005 年种植高抗 5 号	0.38 0.02 c
8	山东省夏津县农业局实验田	2000-2005 年种植鲁棉研 18(GFMcry1A 基因)	0.51 0.13 abc
9	山东省夏津县农业局实验田	2000-2005 年种植中棉所 45(GFMcry1A/CpTI 双价基因)	0.38 0.03 c
10	山东省夏津县农业局实验田	2005 年种植中抗 6 号(Bt 基因来源不祥),2005 年以前种植常规棉花	0.38 0.02 c
11	中国农业科学院廊坊中试基地	2005 年种植 sGK321(GFMcry1A/CpTI 双价基因),2005 年以前种植常规棉花	0.47 0.07 abc
12	中国农业科学院廊坊中试基地	2005 年种植中 12(常规棉),2004 年种植 SGK321	0.47 0.01 abc
13	中国农业科学院廊坊中试基地	2005 年种植晋棉 26 号(GFMcry1A 基因),2003-2004 年种植 Nucon33B(cry1Ac 基因)	0.45 0.02 bc
14	中国农业科学院廊坊中试基地	2005 年种植 GK12(GFMcry1A 基因),2005 年以前种植常规棉花	0.38 0.04 c
15	中国农业科学院廊坊中试基地	2005 年种植 Nucon33B,2005 年以前种植常规棉	0.37 0.06 c
16	湖北天门市试验基地	2005 年种植 DP420B(cry1Ac 基因),2003-2004 种植 DP1560B(cry1Ac 基因)	0.64 0.24 a

注:表中数据为平均值±标准误,同列数据后有相同字母表示差异不显著(P>0.05,新复极差法)。

参考文献:

- sue; Impact of genetically modified organisms) [J]. Plant and Soil, 2004, 266: 77-89.
- [1] STOTZKY G. Persistence and biological activity in soil of the insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis*, especially from transgenic plants. (Special Issue: Impact of genetically modified organisms) [J]. Plant and Soil, 2004, 266: 77-89.
- [2] 马 轩,杜雄明. 提取棉花基因组 DNA 的一点探讨 [J]. 棉花学报, 2004,16(1):40-43. ●