

转 *CryIAc* 抗虫棉对土壤虫生真菌群落的影响^{*}

谢 明^{**} 张艳军 吴 刚

(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/农业部生物防治重点开放实验室 北京 100193)

摘 要 利用大蜡螟 *Galleria mellonella* L. 诱菌法对转 *CryIAc* 抗虫棉 GK-12 及其亲本棉花 SM-3 的根系区域土壤的虫生真菌种类和数量进行监测, 评价转 *CryIAc* 基因对棉田土壤虫生真菌的影响。实验结果显示: 检测到的虫生真菌种类, 在转基因棉 GK-12 及其亲本棉 SM-3 之间无显著差异, 均为球孢白僵菌 (*Beauveria bassiana*) 和金龟子绿僵菌 (*Metarhizium anisopliae*); 在棉花开花初期、盛花期、结铃期或吐絮期, 土壤虫生真菌数量在抗虫棉 GK-12 和亲本 SM-3 之间存在显著的差异, 其他生育期无显著差异; 在距棉花主根不同距离 (5 cm\15 cm\25 cm) 的区域, 土壤虫生真菌数量和种类在抗虫棉 GK-12 和亲本 SM-3 之间无显著差异。

关键词 转基因棉花, 虫生真菌, 虫诱集, 球孢白僵菌, 金龟子绿僵菌

Effects of transgenic *CryIAc* cotton on entomopathogenic fungi in soil

XIE Ming^{**} ZHANG Yan-Jun WU Gang

(State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests/Key Laboratory for Biological Control of Ministry of Agriculture, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

Abstract The species diversity and amount of soil fungi around the roots of the transgenic GK-12 cotton variety containing the *CryIAc* gene was compared to that of the non-transgenic SM-3 variety. There was no significant difference in soil fungal species between GK-12 and SM-3 plants, with the fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* found in the root area of both varieties. There were, however, significant differences in the soil fungal species associated with these two varieties during the boll forming and boll opening periods. There were no differences in species or quantity of fungi found at different distances (5 cm, 15 cm and 25 cm) from the roots of these cotton varieties. These results indicate that the presence of the *CryIAc* gene had no significant effect on fungal species and quantity.

Key words transgenic Bt cotton, entomopathogenic fungi, *Galleria mellonella* bait, *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*

转基因技术是 21 世纪最重要的高新技术之一, 在缓解资源短缺、环境恶化、保障粮食安全、农业可持续发展等方面显现出巨大的潜力。自 20 世纪 80 年代初第 1 个转基因植物问世以来, 以基因工程为代表的现代生物技术发展迅猛, 转基因作物研究在世界范围内取得令人瞩目的进展。

转基因抗虫棉是我国研究开发最为成功、目前唯一实现大规模产业化的转基因作物, 我国转基因棉花主要以转 *CryIAc* 抗虫棉为主, 其种植面积约 350 万 hm^2 , 占我国棉花种植总面积的 80%

以上 (James, 2010)。转基因棉花的大面积种植给人类带来了巨大的经济效益和社会效益, 但同时其对生态安全的潜在风险也在全球范围内引起人们的广泛忧虑。微生物是土壤的重要组成部分, 为转基因作物生态安全性研究的重要检测指标之一。目前, 有关转基因棉花对土壤微生物影响的研究报道已有大量报道, 有些学者认为转基因棉花对土壤微生物种群数量、结构和功能没有影响 (Donegan *et al.*, 1995; 张美俊和杨武德, 2010), 但也有不同的观点 (Balachandar *et al.*, 2008)。

^{*} 资助项目: 转基因专项 (2008ZX08012-004; 2009ZX08011-028B)。

^{**} 通讯作者, E-mail: xiem406@126.com

收稿日期: 2012-02-22, 接受日期: 2012-04-12

虫生真菌是引起昆虫病害流行的主要病原物,是调控田间害虫种群的重要天然因子,虫生真菌的种群数量改变将直接影响地下害虫和地上害虫的数量变化。1986 年 Zimmermann 将虫诱法引入土壤虫生真菌的检测 (Zimmermann, 1986),此方法也用于土壤虫生真菌 (高松等, 1995; Meyling and Eilenberg, 2006; Sun and Liu, 2008) 和土壤线虫病原真菌的分离与筛选 (Chandler *et al.*, 1997)。本研究以转 *CryIAc* 抗虫棉 GK-12 及其亲本棉 SM-3 为研究对象,采用大蜡螟虫诱集法监测转基因棉根区土壤虫生真菌数量的变化,以评价转基因 *CryIAc* 抗虫棉对土壤虫生真菌种类和数量的影响,其实验结果可为转基因 *CryIAc* 抗虫棉对土壤虫生真菌的安全性评价提供理论支持。

1 材料与方法

1.1 供试植物及土壤理化性质

供试棉花品种为转 *CryIAc* 抗虫棉 GK-12 及其亲本常规棉花 SM-3, 2010 年种植于河北省廊坊市旧州乡炊庄村 (中国农业科学院植物保护研究所廊坊科研中试基地), 每个棉花品种设 3 个小区, 每个小区面积为 64 m², 随机区组排列。该试验地土壤为粘性壤土, 土壤有机碳含量 9.0 g/kg, 有机质含量 15.6 g/kg, 全氮含量 310 mg/kg, 碱解氮含量 431.8 mg/kg, 速效磷含量 21.9 mg/kg, 速效钾含量 377.7 mg/kg, pH 值为 8.1。

1.2 供试昆虫种类

试虫为人工饲料饲养的大蜡螟幼虫, 饲料配方为: 面粉 1 000 g、玉米面 1 000 g、麦麸 600 g、酵母粉 600 g、奶粉 600 g、蜂蜡 800 g、蜂蜜 1 233 g 和丙三醇 333 g, 饲养方法参考张刚应和杨怀文 (1996) 的方法。

1.3 土壤样品采集方法

取样位点距棉花主根分别设 5、15 和 25 cm 3 个距离, 每个距离土壤样品采用 5 点法取样, 每个小区 5 点土样混合均匀后留取 1 kg 作为一个样品。取样时, 先用铁铲去掉 2 cm 表层土, 然后用管式采样器垂直取 2~20 cm 深的土壤, 装入 10 号自封袋带回实验室, 样品人工粉碎后直接用于虫诱集实验。根据棉花生育期, 共安排 9 次样品采集, 分别为苗期 (6 月 7 日)、蕾期 (7 月 15 日)、开花初期 (8 月 6 日)、开花盛期 (8 月 24 日)、结铃期

(9 月 10 日)、吐絮前期 (9 月 25 日)、吐絮中期 (10 月 12 日)、吐絮后期 (10 月 26 日)、枯死期 (11 月 12 日)。

1.4 土壤虫生真菌的诱集

土壤虫生真菌的诱集方法为: 每个土壤样品设 3 个重复, 每个重复 200 g 土壤 (湿度自然), 装入一个测试盒 (直径 7.5 cm, 高度 4.5 cm); 选取大小一致的 4 龄大蜡螟幼虫 20 头, 分两层埋入测试盒, 每层 10 头; 将测试盒置置于 (25 ± 1) °C 的生化培养箱内黑暗培养 14 d, 前 4 d 测试盒每天颠倒翻转 2 次, 使试虫与土壤充分接触, 培养 14 d 后调查僵虫数量和真菌种类。

1.5 数据统计与分析

统计不同土壤样本的大蜡螟僵虫数量, 用 SAS6.12 (SAS Institute Inc. USA, 1996) 统计分析软件分析处理间试验数据的显著性差异。单因素方差分析比较转基因棉花与常规亲本棉花同一根系距离区域内虫生真菌数量的差异, 处理间的显著性差异采用 LSD 检验。

2 结果与分析

2.1 GK-12 和 SM-3 根区土壤中虫生真菌种类的差异

实验结果 (表 1) 显示, 大蜡螟虫诱集所得土壤虫生真菌经形态鉴定为球孢白僵菌 (*Beauveria bassiana*) 和金龟子绿僵菌 (*Metarhizium anisopliae*)。在棉花整个生育期内, 距棉花主根 5、15 和 25 cm 的所有土样均可以诱集到球孢白僵菌, 而金龟子绿僵菌仅在蕾期、开花初期、结铃期、吐絮中期、吐絮后期和枯死期被诱集到。除蕾期外, 土样诱集到球孢白僵菌的频率远高于金龟子绿僵菌。土壤中诱集到的虫生真菌的种类在转基因棉 GK-12 和亲本棉 SM-3 之间无显著差异。

2.2 GK-12 和 SM-3 根区 5 cm 土壤中虫生真菌相对数量的差异

在棉花开花初期和盛花期, 距转基因棉 GK-12 主根 5 cm 土壤中虫生真菌的相对数量显著低于其亲本棉 SM-3 ($P < 0.05$)。在棉花其余的生育期, 距 GK-12 主根 5 cm 土壤中虫生真菌的相对数量与 SM-3 无显著差异 ($P > 0.05$) (图 1)。

表 1 转基因棉 GK-12 和亲本棉 SM-3 不同生育期和根系区域土壤虫生真菌的种类及频率

Table 1 The fungal species and frequency in the soil from different root area of transgenic *Cry1Ac* cotton GK-12 and non-transgenic cotton SM-3 at different growth stages

生育期 Growth stages	品种 Varieties	僵虫数占总僵虫数的比率(%) Percentage of cadavers infected by different species of entomopathogenic fungi in all the cadavers					
		距主根 5 cm 5 cm distance from main root		距主根 15 cm 15 cm distance from main root		距主根 25 cm 25 cm distance from main root	
		球孢白 僵菌	金龟子绿 僵菌	球孢白 僵菌	金龟子绿 僵菌	球孢白 僵菌	金龟子绿 僵菌
		<i>Beauveria bassiana</i>	<i>Metarhizium anisopliae</i>	<i>Beauveria bassiana</i>	<i>Metarhizium anisopliae</i>	<i>Beauveria bassiana</i>	<i>Metarhizium anisopliae</i>
苗期	GK-12	100.0	0	100.0	0	100.0	0
Seeding	SM-3	100.0	0	100.0	0	100.0	0
蕾期	GK-12	33.3	66.7	50.0	50.0	23.1	76.9
Budding	SM-3	50.0	50.0	50.0	50.0	100.0	0
开花初期	GK-12	75.9	24.1	60.0	40.0	81.0	19.0
Early flowering	SM-3	67.6	32.4	93.9	6.1	100.0	0
盛花期	GK-12	100.0	0	100.0	0	100.0	0
Full flowering	SM-3	100.0	0	100.0	0	100.0	0
结铃期	GK-12	100.0	0	96.7	3.3	100.0	0
Bolling	SM-3	100.0	0	100.0	0	100.0	0
吐絮前期	GK-12	100.0	0	100.0	0	100.0	0
Early boll opening	SM-3	100.0	0	100.0	0	100.0	0
吐絮中期	GK-12	96.1	3.9	95.6	4.4	97.7	2.3
Mid boll opening	SM-3	100.0	0	94.1	5.9	100.0	0
吐絮后期	GK-12	100.0	0	92.9	7.1	92.3	7.7
Late boll opening	SM-3	100.0	0	64.3	35.7	100.0	0
枯死期	GK-12	97.9	2.1	96.2	3.8	95.0	5.0
Death	SM-3	97.9	2.1	92.4	7.6	99.3	0.7

2.3 GK-12 和 SM-3 根区 15 cm 土壤中虫生真菌相对数量的差异

在棉花盛花期、结铃期和吐絮前期,距 GK-12 主根 15 cm 土壤中虫生真菌的相对数量显著低于 SM-3 ($P < 0.05$)。在棉花其余的生育期,距 GK-12 主根 15 cm 土壤中虫生真菌的相对数量与 SM-3 无显著差异 ($P > 0.05$) (图 2)。

2.4 GK-12 和 SM-3 根区 25 cm 土壤中虫生真菌相对数量的差异

在棉花开花初期,距转基因棉 GK-12 主根 25 cm 土壤中虫生真菌的相对数量显著高于其亲本棉 SM-3 ($P < 0.05$);而在棉花吐絮前期,距 GK-12 主根 25 cm 土壤中虫生真菌的相对数量显著低于 SM-3 ($P < 0.05$)。在棉花其余的生育期,距

GK-12 主根 25 cm 土壤中虫生真菌的相对数量与 SM-3 无显著差异 ($P > 0.05$) (图 3)。

3 讨论

大蜡螟虫诱法用于研究土壤虫生真菌已有 30 余年历史 (Zimmermann, 1986),前人研究多采用该法从不同来源的土壤样品中分离虫生真菌,对土壤中虫生真菌的发生频率也有研究 (高松等, 1995; Chandler *et al.*, 1997)。本论文在前人研究的基础上,加大诱集时的大蜡螟幼虫数,设置多次重复,对转 *Cry1Ac* 抗虫棉 GK-12 及其亲本棉 SM-3 土壤虫生真菌进行了为期 1 年的连续监测,研究结果表明,转基因 *Cry1Ac* 抗虫棉 GK-12 根区土壤虫生真菌种类与亲本棉 SM-3 无差异。在土壤虫

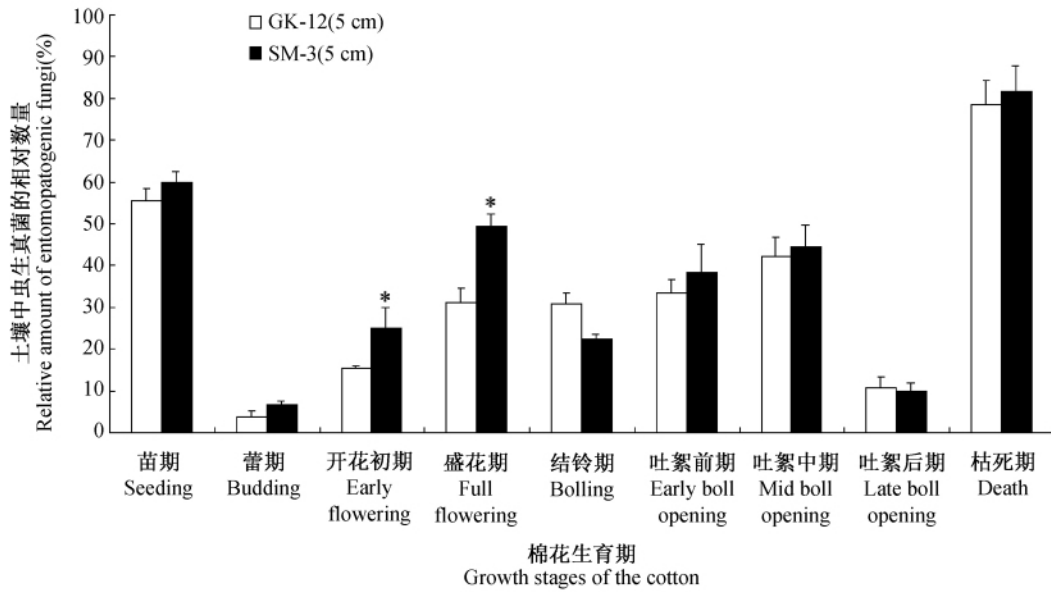


图 1 转基因棉 GK-12 与亲本棉 SM-3 根系 5 cm 区域土壤虫生真菌的相对数量比较

Fig.1 Comparison of the relative amount of entomopathogenic fungi in the 5 cm soil distance from the root between transgenic cotton GK-12 and non-transgenic cotton SM-3

注: * 表示差异显著, $P < 0.05$ 。下图同。

* indicates significant difference at 0.05 level. The same below.

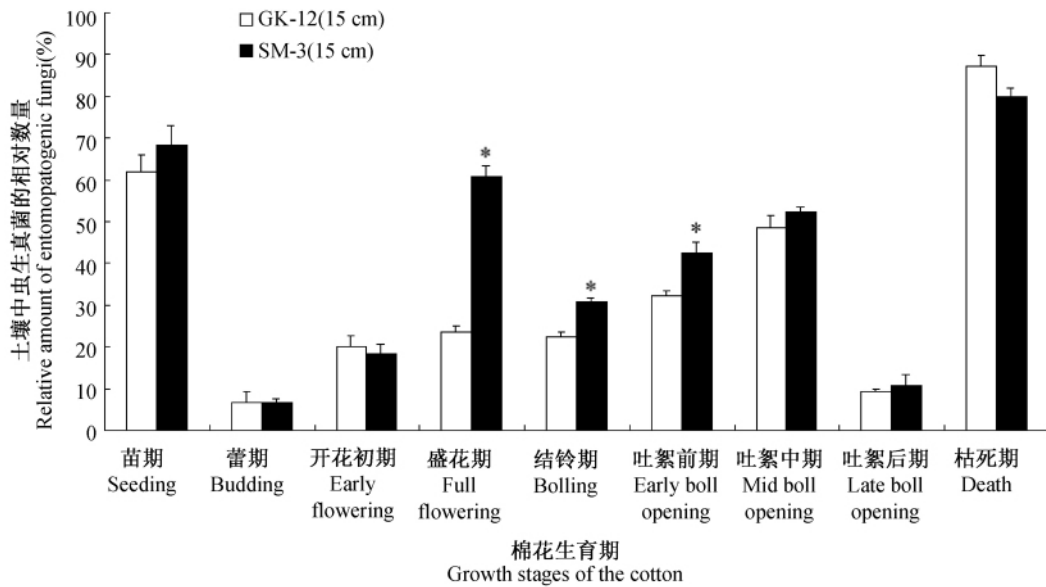


图 2 转基因棉 GK-12 与亲本棉 SM-3 根系 15 cm 区域土壤虫生真菌的相对数量比较

Fig.2 Comparison of the relative amount of entomopathogenic fungi in the 15 cm soil distance from the root between transgenic cotton GK-12 and non-transgenic cotton SM-3

生真菌数量方面,在棉花开花初期、盛花期、吐絮期等生育期存在一定的差异,这些差异是否会累

积,是否会进一步影响土壤总体微生物区系平衡,尚不清楚。本研究设置了 3 个土壤样品采集距

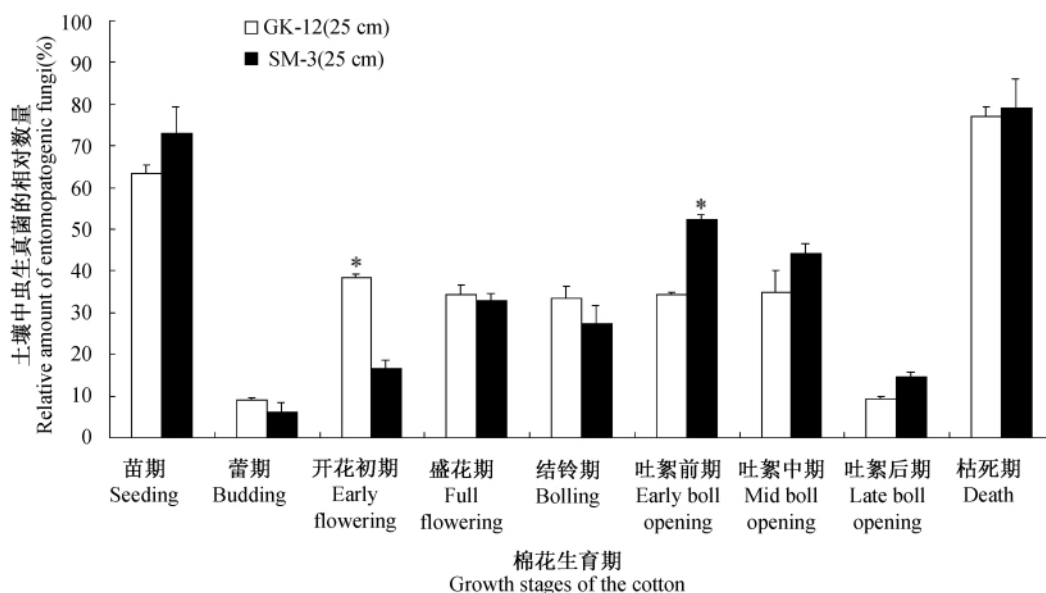


图3 转基因棉 GK-12 与亲本棉 SM-3 根系 25 cm 区域土壤虫生真菌的相对数量比较

Fig. 3 Comparison of the relative amount of entomopathogenic fungi in the 25 cm soil distance from the root between transgenic cotton GK-12 and non-transgenic cotton SM-3

离,结果表明3个距离的土壤样品间,虫生真菌种类和数量无显著差异。

大蜡螟虫诱法研究土壤虫生真菌具有高灵敏的优点,本实验中土样虫诱集所得僵虫率范围为3.9%~87.2%,诱集到的虫生真菌有白僵菌和绿僵菌,其结果与前人研究基本吻合(高松等,1995)。虽然棉花生育期对土壤虫生真菌的数量有一定影响,但是本研究中棉花苗期和枯死期的数据明显高于其它生育期,而棉花蕾期和吐絮后期土样的数据却远低于其它生育期,这一现象可能与样品采集时的气象情况有关,棉花苗期和枯死期土样的湿度适中,而棉花蕾期土样因采集前下过一次大雨,土壤湿度偏大,影响土壤真菌的数量。

参考文献(References)

- Balachandar D, Raja P, Nirmala K, Rithyl TR, Sundaram SP, 2008. Impact of transgenic Bt-cotton on the diversity of pink-pigmented facultative methylotrophs. *World J. Microb. Biot.*, 24(10):2087—2095.
- Chandler D, Hay D, Reid AP, 1997. Sampling and occurrence of entomopathogenic fungi and nematodes in UK soils. *Appl. Soil Ecol.*, 5(2):133—141.
- Donegan KK, Palm CJ, Fieland VJ, Porteous LA, Ganio LM,

Harris DL, Bucuo LQ, Seidler RJ, 1995. Changes in levels, species and DNA fingerprints of soil microorganisms associated with cotton expressing the *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* endo-toxin. *Appl. Soil Ecol.*, 2(2):111—124.

James C, 2010. Global status of commercialized Biotech/GM crops:ISAAA Brief, No. 42. ISAAA:Ithaca, NY.

Meyling N, Eilenberg J, 2006. Occurrence and distribution of soil borne entomopathogenic fungi within a single organic agroecosystem. *Agric. Ecosyst. Environ.*, 113(1/4):336—341.

Sun BD, Liu XZ, 2008. Occurrence and diversity of insect-associated fungi in natural soils in China. *Appl. Soil Ecol.*, 39(1):100—108.

Zimmermann G, 1986. The 'Galleria bait method' for detection of entomopathogenic fungi in soil. *J. Appl. Ent.*, 102(1/5):213—215.

高松, 农向群, 邓春生, 1995. 利用大蜡螟诱集法从土壤中分离昆虫病原真菌. 中国生物防治, 11(3):142—143.

张刚应, 杨怀文, 1996. 大蜡螟室内饲养技术. 贵州农学院学报, 15(1):46—49.

张美俊, 杨武德, 2010. 转 Bt 基因棉叶对土壤微生物多样性的影响. 中国生态农业学报, 18(2):307—311.