

“转基因稻谷储藏适宜性及机理”特约专栏文章之三

DOI: 10.16210/j.cnki.1007-7561.2020.06.013

转基因稻谷 Bt 蛋白降解及长期取食对印度谷螟体内 3 种抗氧化酶活性的影响

王康旭, 吴学友, 陶冶心, 陈二虎, 唐培安✉

(南京财经大学 食品科学与工程学院, 江苏高校粮油质量安全控制及深加工重点实验室, 江苏 南京 210023)

摘要: 转 *Cry1Ab/Cry1Ac* 基因稻谷 (华恢 1 号) 可以用于储粮害虫印度谷螟的防治, 前期研究表明在其短期取食含有 Bt 毒蛋白的稻谷后, 其体内三种主要的抗氧化酶过氧化物酶 (peroxidase, POD)、过氧化氢酶 (catalase, CAT) 和超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 的活力会发生明显变化。聚焦储藏期间的特性开展研究, 结果发现, 转基因稻谷稻壳和糙米中 Bt 蛋白含量分别为 5.534 $\mu\text{g/g}$ 和 1.003 $\mu\text{g/g}$, 在 25 $^{\circ}\text{C}$ 下经过 270 d, 其降解率分别为 67.3% 和 27.7%。利用酶活力测定方法研究长期取食转 Bt 稻谷所制大米粉对印度谷螟幼虫体内上述三种酶活性的影响, 结果表明, 在含有不同比例的转 Bt 大米粉饲喂印度谷螟 12 d 及连续饲养 5 个月后, 其体内的 SOD 活力均受到了显著抑制。但是对于 POD 而言, 在长期取食不同含量的转 Bt 大米粉后, 印度谷螟体内 POD 活性与对照相比产生了显著提高。同时, 在印度谷螟幼虫长期取食转 Bt 大米粉后, 其体内 CAT 活力随着含 Bt 大米粉比例的提高而显著增强。另外, 使用转基因大米粉连续饲养 5 个月的印度谷螟种群体内的保护酶活力同喂食 12d 后的酶活变化趋势一致。结果说明在长期取食含有 Bt 毒素的大米粉后, 印度谷螟幼虫体内三种保护酶的增减趋势存在差异, 这表明印度谷螟体内三种保护酶可能存在不同的调节机制来应对 Bt 毒素的胁迫, 这对于转 Bt 作物的毒理和相关抗性机理研究提供了理论依据。

关键词: 转基因稻谷; Bt 蛋白; 晶体蛋白; 印度谷螟; 保护酶; 过氧化物酶; 过氧化氢酶; 超氧化物歧化酶

中图分类号: TS201.4 文献标识码: A 文章编号: 1007-7561(2020)06-0111-07

网络首发时间: 2020-10-27 16:33:09

网络首发地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3863.TS.20201027.1611.003.html>

Degradation of Bt Protein in Stored Transgenic Rice and its Effect on the Activity of Three Protective Enzymes in Indian Meal Moth, *Plodia interpunctella*(Hübner)

WANG Kang-xu, WU Xue-you, TAO Ye-xin, CHEN Er-hu, TANG Pei-an✉

收稿日期: 2020-07-22

基金项目: 粮食公益性行业科研专项(201413007-02, 201513002-05-03); 国家重点研发计划(2016YFD0401004-4, 2017YFD0401003-5); 江苏省六大人才高峰高层次人才项目(NY-057); 江苏高校优势学科建设工程资助项目。

作者简介: 王康旭, 男, 1991 年出生, 博士, 讲师, 研究方向为储粮新技术及有害生物综合防控。E-mail: wangkx@nufe.edu.cn.

通讯作者: 唐培安, 男, 1981 年出生, 博士, 教授, 研究方向为粮食储藏新技术、储粮害虫防治以及转基因稻谷的储藏安全性评估。E-mail: tangpeian@163.com.

(Collaborative Innovation Center for Modern Grain Circulation and Safety, College of Food Science and Engineering, Nanjing University of Finance and Economics, Nanjing, Jiangsu 210023, China)

Abstract: Transgenic *cry1Ab/cry1Ac* rice (Huahui 1) is able to control the stored pest *Plodia interpunctella*. Our previous study confirmed that the enzymatic activities of three major antioxidases, including POD, CAT, and SOD, could be significantly changed after short-term stressed with these Bt containing rice. This study focused on the characteristics of rice during storage, the results showed that the Bt protein content in rice husk and brown rice was 5.534 $\mu\text{g/g}$ and 1.003 $\mu\text{g/g}$ respectively, and after 270 days at 25 $^{\circ}\text{C}$, the degradation rate was 67.3% and 27.7%, respectively. Moreover, the enzymatic activities of three antioxidases in *P. interpunctella* long-term fed with transgenic *cry1Ab/cry1Ac* rice powder would be addressed by enzymatic detection assays. Our data showed that the SOD activities could be significantly inhibited by the Bt containing rice after fed with Bt-rice powder for 12 days or 5 months, However, the enzymatic activities of POD and CAT significantly increase with the concentrations of Bt toxins. In addition, the change trend of protective enzyme activity in the Indian Meal Moth fed with transgenic rice flour for 5 months was consistent with that after 12 days of feeding. Our researches find that there are differences in the trend of increase and decrease of the three major protective enzymes after fed with Bt containing rice powder for a long time, which indicates that the expression mechanisms of the three protective enzymes might be different. Our results provide a theoretical basis for the study of toxicology and related resistance mechanism of transgenic Bt crops.

Key words: transgenic rice; Bt protein; crystal protein; *P. interpunctella*; protective enzymes; peroxidase; catalase; superoxide dismutase

印度谷螟 *Plodia interpunctella* (Hübener) 是世界性的鳞翅目储粮害虫, 能够危害稻谷、小麦、玉米、干果、药材和多种作物种子的生产和储藏^[1]。传统防治方法具有抗性发生普遍、残留风险高等缺点, 严重威胁了粮食和食品安全的有力保障^[2]。转基因抗虫水稻, 是指将非水稻来源的抗虫基因导入水稻体内所培育出的新型水稻品种^[3]。其中的抗虫基因大多来源于苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*, Bt), 这是因为 Bt 在其形成芽孢的过程中会产生具有杀虫效果的晶体蛋白 (cry)^[4], 在借助基因工程的方法后, 可以在水稻中大量表达此类杀虫蛋白, 赋予作物抗虫性^[5]。研究表明, 转 Bt 基因水稻对多种鳞翅目昆虫均具有良好的防治效果, 例如稻纵卷叶螟 *Cnaphalocrocis medinalis*、印度谷螟和二化螟 *Chilo suppressalis* 等^[6-7]。

保护酶是昆虫体内最主要的生理生化相关酶系之一, 主要包括过氧化物酶 (peroxidase, POD)、过氧化氢酶 (catalase, CAT) 和超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 等^[8]。一般而言, 生物体中的保护酶会长期处于一种动态平衡状

态, 使游离自由基保持在一个较低水平状态, 以避免自由基对机体的破坏, 起到保护作用。但是, 一旦生物体内的保护酶平衡被打破, 机体就可能受到自由基的伤害。同时研究表明, 当昆虫取食 Bt 毒蛋白后, 体内保护酶的平衡会遭到破坏, 过量的自由基会损伤机体。此时昆虫为了保护和维护机体的正常功能就会升高保护酶活性, 从而影响害虫的生理状态^[9]。

前期研究表明, 在短期取食转 Bt 稻谷后, 印度谷螟体内的三种保护酶活力呈现上调趋势, 但是长期取食转 Bt 稻谷及其制品后害虫体内的保护酶活力状态尚不清楚, 影响了害虫对转 Bt 作物的相关毒理机制研究^[10-11]。本实验以印度谷螟幼虫为试虫, 利用转 Bt 稻谷为原料制取得到的大米粉为饲料, 对试虫进行长期喂食处理, 通过酶活分析方法研究了印度谷螟幼虫在长期取食转 Bt 水稻制品后体内的保护酶活性变化。本研究不仅有利于揭示转 Bt 稻谷对于印度谷螟作用的生理生化机理, 还可以为相关毒理学机制提供深入研究依据, 有利于转基因稻谷的安全储藏和合理利用。

1 材料与方法

1.1 供试水稻及虫源

稻谷华恢 1 号：通过基因枪法介导，将融合抗虫基因 *CryIAb/CryIAc* 导入非转基因水稻品系明恢 63 获得的转 Bt 基因抗虫水稻，由华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室提供，标记为 HH/Bt。

稻谷明恢 63：为转 *CryIAb/CryIAc* 基因水稻华恢 1 号的非转基因亲本对照，标记为 MH/CK。

实验所采用的印度谷螟品系采自江苏省吴江市，用完全不含 Bt 毒素（明恢 63）的大米粉在实验室内连续喂养 2 年，作为敏感种群。饲养条件为：温度(30±0.5) °C、湿度 70%~80%、黑暗条件培养。

1.2 储藏条件

将新收获的转 *CryIAb/CryIAc* 基因稻谷(HH/Bt) 样品从低温贮藏室中取出，恢复至室温后，经除杂后，分装在 5 L 广口瓶中，盖紧橡胶塞，并用石蜡密封瓶口，置于(25±1) °C 人工气候箱中储藏，每隔 30 d 取样一次，检测水分和 Bt 蛋白含量。供试稻谷明恢 63 (MH/CK) 做同样处理。

1.3 水分测定

稻谷样品的水分测定按照 GB 5009.3—2016 直接干燥法进行。

1.4 Bt 蛋白含量测定

采用酶联免疫吸附测定法(ELISA)。测定时，将稻谷提取物加入到已经由 *CryIAb/CryIAc* 蛋白抗体包被的微孔板中，抗体同样品提取物中的目标蛋白进行作用，之后加入辣根过氧化物酶标记(HRP-labeled)的 *CryIAb/CryIAc* 二抗，进行检测。产物在 450 nm 处有吸收峰，且产物颜色与 OD 值在一定范围内呈正比，因此，可根据标准曲线求得样品 *CryIAb/CryIAc* 蛋白含量。

1.5 试虫处理

将不同质量的转 Bt 基因大米粉掺入普通米粉中，充分搅拌混匀，配制成含量为 50、100、200、400 mg/g 的转 Bt 基因大米粉的饲料。取实验室长期培养的印度谷螟 5 龄幼虫若干只，饥饿处理 24 h 后作为供试虫体。所有试虫分为 3 组。置于 2 cm 直径的培养盒中，每个培养盒接种一头，分别用

含有 0、50、100、200、400 mg/g 的转 Bt 基因大米粉饲养 12 d 后取样。另外，我们从敏感种群中随机挑选了部分试虫，在含有 50、100 mg/g 转基因大米粉的饲料中连续筛选培养 5 个月 after 取样。所有样品冷冻保存于-80 °C 冰箱中，用于酶源制备。

1.6 酶源制备

待匀浆的印度谷螟幼虫经过流动的纯净水冲洗后，用滤纸将表面水分吸干。对幼虫进行称重，置于试虫 9 倍重的 0.9% 的低温生理盐水的玻璃匀浆器中进行研磨，之后将匀浆液在 2 000~3 000 r/min 下低温离心 15 min，取离心后上清液作为待测酶源，置于-80 °C 冰箱中保存备用。实验重复 3 次。

1.7 酶源蛋白质含量测定

采用考马斯亮蓝 G-250 法测定待测酶源中的总蛋白含量，以牛血清蛋白(BSA)为标准蛋白进行计算。

1.8 酶活性测定

本实验采用南京建成生物工程研究所生产的 SOD、POD 和 CAT 活力检测试剂，按试剂盒说明进行操作。被测样品的抗氧化酶活性计算公式如下：

$$\begin{aligned} \text{总SOD活力}(U / \text{mgprot}) = & \frac{\text{对照OD值} - \text{测定OD值}}{\text{对照OD值}} \div \\ & 50\% \times \frac{\text{反应液总体积}(ml)}{\text{取样量}(ml)} \div \\ & \text{待测样本蛋白浓度}(\text{mgprot} / \text{ml}) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{POD活力}(U / \text{mgprot}) = & \frac{\text{测定OD值} - \text{空白OD值}}{12 \times \text{比色光径}(1.0\text{cm})} \times \\ & \frac{\text{反应液总体积}(ml)}{\text{样本量}(ml)} \div \text{反应时间}(30\text{分钟}) \div \\ & \text{待测样本蛋白浓度}(\text{mgprot} / \text{ml}) \times 1000 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{CAT活力}(U / \text{gHb}) = & \log \frac{\text{OD}_1}{\text{OD}_2} \times \frac{2.303}{60\text{秒}} \times \text{样本测试前稀释倍数} \times \\ & \text{反应体系稀释倍数} \div \\ & \text{待测匀浆蛋白浓度}(\text{gprot} / \text{ml}) \end{aligned}$$

1.9 数据统计与分析

采用 GraphPad 软件 LSD 方法进行方差分析，重复数据计算其平均值和标准误(SE)。

2 结果与分析

2.1 稻谷水分含量变化

储藏前, HH/Bt 和 MH/CK 稻谷的初始水分分别为 13.31% 和 13.18%, 无显著差异 ($P>0.05$)。在随后的 270 d 储藏期内, 对 HH/Bt 稻谷的水分含量进行的检测分为糙米和稻壳两部分进行, 结果见图 1。从 HH/Bt 稻谷的糙米和稻壳水分变化趋势可以看出, 随着储藏时间增加, 其水分含量在逐渐降低, 在 270 d 的储藏期内, HH/Bt 糙米水分由储藏前的 13.31% 下降至 12.46%, HH/Bt 稻谷稻壳的水分由储藏前的 10.11% 下降至 8.54%。

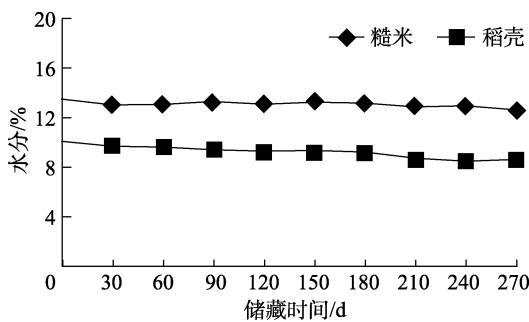


图 1 储藏期内 HH/Bt 稻谷 (糙米和稻壳) 水分变化

2.2 Bt 蛋白标准曲线

以 1.8×10^{-2} 、 1.5×10^{-2} 、 1.0×10^{-2} 、 5.0×10^{-3} 和 1.0×10^{-3} $\mu\text{g/mL}$ 浓度梯度的 *CryIAb* 标准液, 经 Envirotoxic *CryIAb/CryIAc* 平板试剂盒酶联免疫反应后, 在 450 nm 波长下, 用多功能酶标仪读取波长其 OD 值, 绘制的标准曲线如图 2 所示。

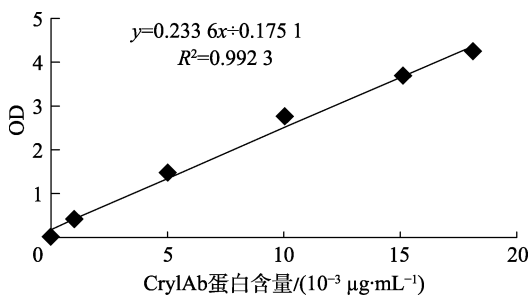


图 2 Bt 蛋白标准曲线

2.3 储藏期内稻谷 Bt 蛋白含量变化

在 25 °C 条件下, 历时 270 d (9 个月) 的储藏期内, 转 *CryIAb/CryIAc* 基因稻谷的糙米和稻壳中 Bt 蛋白含量的变化分别如图 3、图 4 所示, 测定结果显示, 随着储藏时间的增加, HH/Bt 稻

谷的糙米和稻壳中 Bt 蛋白含量均降低, HH/Bt 稻谷的糙米中 Bt 蛋白含量由储藏前的 5.534 $\mu\text{g/g}$, 在储藏 90、180、270 d 后分别降至 4.818、4.551、4.003 $\mu\text{g/g}$ 。HH/Bt 稻谷的稻壳中 Bt 蛋白含量由储藏前的 1.003 $\mu\text{g/g}$, 在储藏 90、180、270 d 后分别降至 0.839、0.672、0.328 $\mu\text{g/g}$ 。在 270 d 的储藏期内, HH/Bt 稻谷的稻壳中 Bt 蛋白的自然降解率较糙米中的大, HH/Bt 稻谷的糙米和稻壳中 Bt 蛋白降解率分别为 27.7% 和 67.3%。

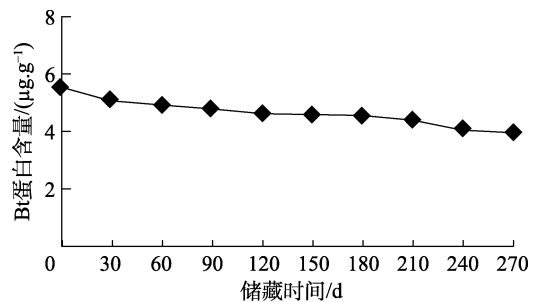


图 3 储藏期内 HH/Bt 稻谷的糙米中 Bt 蛋白含量变化

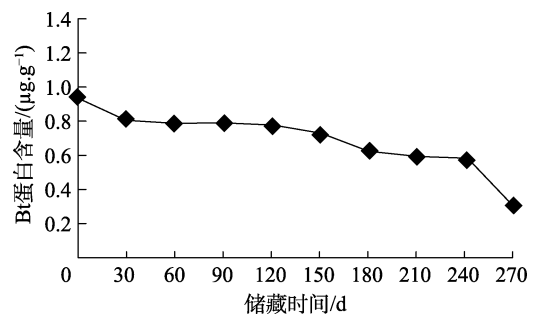


图 4 储藏期内 HH/Bt 稻谷的稻壳中 Bt 蛋白含量变化

储藏期内 HH/Bt 稻谷的糙米和稻壳中 Bt 蛋白含量的差异分析结果表明, 随着储藏时间的延长, 转 *CryIAb/CryIAc* 基因稻谷的糙米和稻壳中 Bt 蛋白的含量显著下降 ($P<0.05$), 储藏 60、240 d 后, 糙米和稻壳中 Bt 蛋白含量分别为 4.930、4.067、0.842、0.623 $\mu\text{g/g}$ 。同一储藏期, 对糙米和稻壳中的 Bt 毒蛋白含量的差异分析结果表明, 储藏前 (0 d) 转 *CryIAb/CryIAc* 基因稻谷的糙米和稻壳中 Bt 蛋白的含量差异极显著 ($P<0.05$), 储藏 270 d 后, 该转基因稻谷的糙米和稻壳中 Bt 蛋白含量差异仍极显著 ($P<0.05$)。

2.4 转 Bt 基因大米粉对印度谷螟幼虫体内 SOD 活性的影响

转 Bt 基因大米粉对印度谷螟幼虫体内 SOD 的影响如图 5 所示。在用不同浓度的转 Bt 基因大

米粉饲喂印度谷螟幼虫 12 d 后, 其体内 SOD 活性随着取食饲料中转 Bt 基因水稻浓度的上升而下降, 在取食 400 mg/g 转 Bt 基因水稻后, SOD 活性与对照相比差异达到最大, 下降了 28.4%。另外, 图 6 显示了用 50、100 mg/g 的转 Bt 基因大米粉持续饲养印度谷螟 5 个月后, 对试虫种群体内的 SOD 活性进行测定的结果, 发现取食含有 50、100 mg/g 的转基因大米粉饲料的印度谷螟种群的 SOD 活性与对照相比分别下降了 10.33%、38.75%, 该结果与 12 d 的饲养处理结果趋势基本一致。深入分析认为, 在长期取食转 Bt 基因大米粉后, 幼虫体内的 SOD 活性明显受到抑制, 并且取食的饲料中转基因大米粉含量越高, SOD 活性抑制效果越显著。这说明, 长期取食转 Bt 基因水稻后, Bt 毒蛋白可能会抑制 SOD 对体内 O_2 的清除。

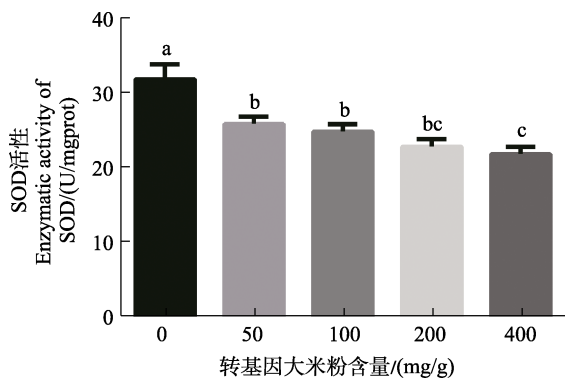


图 5 不同含量转基因大米粉饲养印度谷螟幼虫 12 天对其 SOD 酶活力的影响

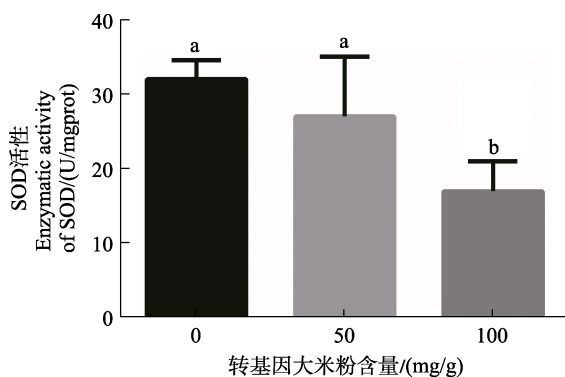


图 6 由不同含量转基因大米粉饲养 5 个月后的印度谷螟种群体内的 SOD 活性

2.5 转 Bt 基因水稻对印度谷螟幼虫体内 POD 活性的影响

在用不同含量的转 Bt 基因水稻饲喂印度谷螟幼虫 12 d 后, 其体内 POD 活性变化的情况如图 7 所示, 取食转 Bt 基因水稻后, 幼虫体内的 POD

活性显著升高, 且随着饲料中转 Bt 基因水稻浓度的上升而下降, 但始终高于对照组。图 8 表明利用不同含量的转 Bt 基因大米粉饲料饲养 5 个月的印度谷螟种群, 其幼虫体内的 POD 活性进行测定的结果, 该结果与 12 d 的饲养结果一致, 通过转基因大米粉的 POD 活性高于对照组。由此可见, 在利用转基因大米粉长期饲养印度谷螟后, 其体内的 POD 活性明显升高, 说明其抵抗 Bt 毒素的能力显著增强, 通过提高试虫体内的 POD 活性以维持细胞内 H_2O_2 的动态平衡。然而摄入高浓度 Bt 毒素的幼虫体内 POD 活性比摄入低浓度的低, 这可能是由于印度谷螟幼虫对低浓度 Bt 毒素具有更快更强的适应性, 形成了较为完善的防御系统。

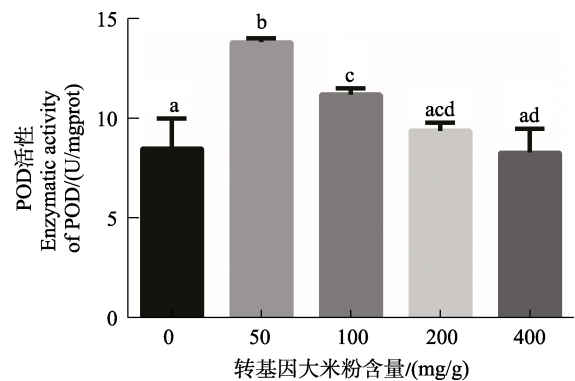


图 7 不同含量转基因大米粉饲养印度谷螟幼虫 12 天对其 POD 活性的影响

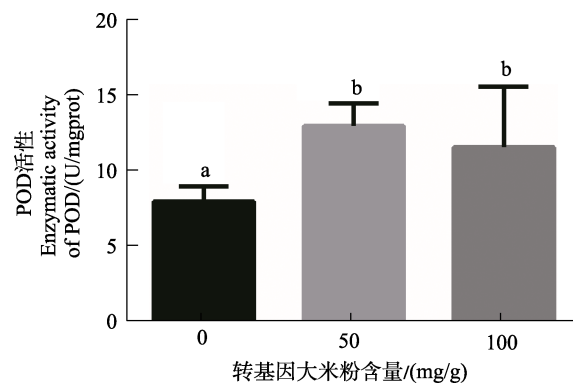


图 8 由不同含量转基因大米粉饲养 5 个月后的印度谷螟种群体内的 POD 活性

2.6 转 Bt 基因水稻对印度谷螟幼虫体内 CAT 活性的影响

由图 9 可以看出, 在印度谷螟幼虫取食转基因大米粉含量 > 50 mg/g 的大米粉饲料后, 其体内的 CAT 活性均显著高于对照组, 且随着 Bt 大米粉含量的增加, CAT 活性呈增加趋势。图 10 表明利用不同含量的转 Bt 基因大米粉饲料饲养 5 个月

的印度谷螟种群，其体内 CAT 活性的变化。在长期摄入 Bt 毒素后，幼虫体内的 CAT 活性均显著高于对照组。

由此可见，在印度谷螟幼虫长期取食含有 Bt 大米粉的饲料后，其体内 CAT 活性会发生上调，可能可以借此来清除体内过量的 H₂O₂，从而维持细胞内游离自由基的相对稳定，以抵抗 Bt 毒素的胁迫。

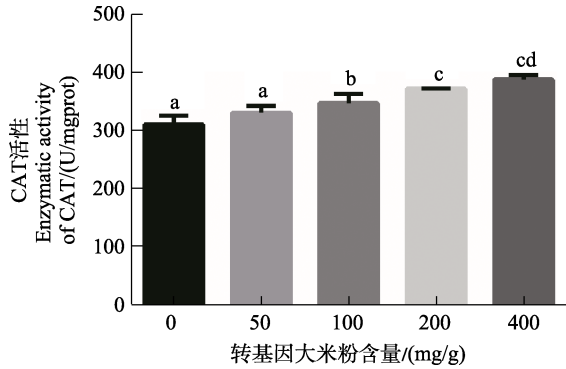


图 9 不同含量转基因大米粉饲养印度谷螟幼虫 12 天对其 CAT 活性的影响

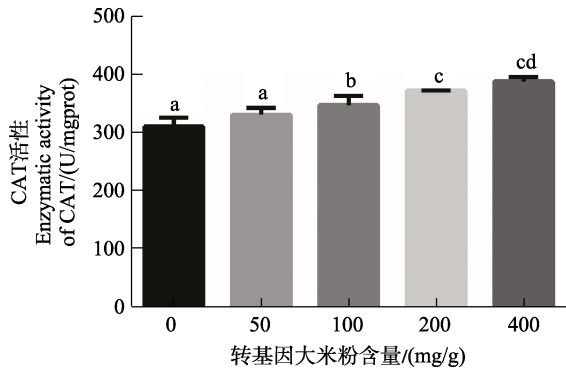


图 10 由不同含量转基因大米粉饲养 5 个月后的印度谷螟种群体内的 CAT 活性

3 讨论

本试验针对 25 °C 仓储条件下，水分含量为 13% 的转 *CryIAb/CryIAc* 基因稻谷 (HH/Bt) 进行为期 270 d 的储藏研究，研究表明，随着储藏时间的增加，HH/Bt 稻谷的糙米和稻壳的水分在逐渐降低，HH/Bt 稻谷的糙米和稻壳中 Bt 蛋白含量显著下降；同一储藏期，HH/Bt 稻谷的糙米中 Bt 蛋白含量显著高于稻壳。林镇清等^[12]以早籼稻为材料，进行高大平房仓储藏，跟踪测定了 2006 年 3 月至 2008 年 7 月期间，仓中稻谷水分含量的变化，指出质量好的稻谷，在控温、控湿较为理想的仓房内，稻谷水分会随着储藏时间的延长而逐渐降低。本文对转基因稻谷的水分变化研究结果与其所得结论相一致。

谢小波和舒庆尧等^[13]对美国一龙公司 (EnvirotoGix) 开发的 *CryIAb/CryIAc* 平板试剂盒用于转 *CryIAb* 基因水稻中 Bt 蛋白含量测定进行了评估，指出该试剂盒具有良好的检测灵敏度和快速的特点，其最低 Bt 蛋白检测浓度为 0.5 ng/g。本试验所采用的试剂盒是 EnvirotoGix 在原 *CryIAb/CryIAc* 检测试剂盒基础上加以改进以适合转基因稻谷检测之用。Tu 等^[14]开发的转 *CryIAb/CryIAc* 基因水稻估测其 Bt 蛋白表达量占总可溶蛋白的 0.01%~0.20%，为高表达水平，继而开发的该转 *CryIAb/CryIAc* 基因水稻明恢 63 (T51-1) Bt 蛋白含量高达 20 μg/g^[15]。姜永厚等^[16]对转 *CryIAb* 基因克螟稻 1 号 (亲本为秀水 11) 孕穗期和成熟期的茎秆中 Bt 蛋白含量测定结果分别为 43.20、22.27 μg/g，而吴立成^[17]对成熟期该转基因水稻地上部分 Bt 蛋白含量测定结果为 7.98 μg/g。Bashir 等^[18]对转 *CryIAc* 和 *Cry2A* 的印度香米收获 10 d 后的子粒中 Bt 含量测定结果分别为 0.3、0.26 μg/g。陈浩^[19]测定的转 *CryIAc*、*Cry2A**、*Cry9C** 基因的水稻明恢 63 (TAC-2、T2A-1、T9C-3) 成熟种子中 Bt 蛋白的含量分别为 8.15、12.98、20.10 μg/g。对于上述所测定的 Bt 蛋白的差异，亲本水稻性状、构建的基因、启动子、生长环境等都会影响到转 Bt 基因水稻中 Bt 蛋白的表达水平。

自然环境储藏条件下，赵文娟^[20]的对转 *CryIAc/SCK* 基因 II 优 MS67 的 Bt 蛋白含量进行连续 9 个月监测结果显示，Bt 蛋白含量在 1.262~1.593 μg/g，且在前期储藏中蛋白降解较快，后期降解速度趋于平缓。转 Bt 基因谷物中的 Bt 蛋白降解途径有：自身代谢分解、光照、微生物分解等。宋伟等^[21]的研究指出在 25 °C，13.5% 水分含量的储藏稻谷中，霉菌等微生物的数量相对较少。本文模拟 25 °C、无光照的仓储条件，研究 HH/Bt 稻谷对 Bt 蛋白的自身代谢分解，对转 *CryIAb/CryIAc* 基因稻谷 270 d 的储藏中，糙米和稻壳中的 Bt 蛋白的自然降解规律与前述报道呈一致性。

随着转基因作物的推广和应用，研究人员对 Bt 伴胞晶体蛋白的相关杀虫机理已进行了详尽的研究，在相关害虫取食转 Bt 作物后，害虫机体会产生相应的应激反应，导致了系列代谢变化，若 Bt 毒素刺激能够控制在范围内，虫体可以通过调整对应的代谢功能以适应相应的代谢影响，若刺激

强度超过虫体的代谢能力时,会影响害虫的生理状态。所以,我们可以通过研究昆虫体内酶系的变化情况来分析 Bt 毒素的相关毒理学机制。昆虫体内广泛存在以 SOD、CAT 和 POD 为代表的保护酶系统,能够保护昆虫机体免受自由基损伤,在昆虫多种生理生化过程中发挥着关键性的作用^[11]。本试验研究了印度谷螟取食转 Bt 大米粉后,其体内的主要保护酶的对应变化,深入探究了害虫长期摄入 Bt 毒蛋白与其机体代谢情况的对应关系。

在转 Bt 水稻短时诱导培养中,印度谷螟幼虫体内 SOD 活力上升,而 CAT 和 POD 的活力低于对照,受到了抑制,说明印度谷螟作为转 Bt 基因水稻的靶标害虫, Bt 毒蛋白被幼虫摄入后,短期内可扰乱幼虫 SOD, CAT 和 POD 保护酶系统的动态平衡,对害虫机体产生毒害作用。本试验在此基础上研究了印度谷螟长期取食不同含量转 Bt 基因大米粉 12 d 及连续筛选饲养 5 个月后,其体内保护酶的变化情况,该结果与转 Bt 基因稻谷短期饲喂幼虫结果显著不同。在长期喂食试验中,我们发现 SOD 活性显著低于对照组,而 POD 和 CAT 的活性高于对照组。这说明印度谷螟幼虫在较为长期取食 Bt 毒蛋白的过程中,自身形成了较为完善的防御系统,可能通过提高 POD 和 CAT 的活性来实现 H₂O₂、氧化酚类和胺类化合物的催化反应,从而有效清除了体内 H₂O₂ 和酚类、胺类物质毒性^[11]。而长期喂食后, SOD 活性仍然受到了抑制,这说明三种保护酶的表达调控机制可能存在一定的差异,虫体通过 POD 和 CAT 活性的提高以弥补 SOD 活力的下降,以保护和维持机体进行正常的代谢,使试虫对 Bt 毒素产生了一定的耐受性,但是保护酶的相关调控网络还有待进一步探索。另外,我们还对取食转基因大米粉后的印度谷螟生长发育情况进行了系统性探索^[23],同时,还利用转录组测序技术对取食转基因大米粉后的印度谷螟中的差异表达基因进行了分析^[24],相关结果将同本文研究一道为揭示 Bt 毒素的抗性机理以及毒理学效应奠定了理论基础。

参考文献:

- [1] MOHANDASS S, ARTHUR F H, ZHU K Y, et al. Biology and management of *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae) in stored products[J]. *J Stored Prod Res*, 2007, 43: 302-311.
- [2] GAUTAM S G, OPIT G P, HOSODA E, Phosphine resistance in adult and immature life stages of *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae) and *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae) populations in California[J]. *J Econ Entomol*, 2016, 109: 2525-2533.
- [3] BATES S L, ZHAO J Z, ROUSH R T, et al. Insect resistance management in GM crops: Past, present and future[J]. *Nat Biotechnol*, 2005, 23: 57-62.
- [4] MARVIER M, McCREEDY C, REGETZ J, et al. A meta-analysis of effects of Bt cotton and maize on nontarget invertebrates[J]. *Science*, 2007, 316: 1475-1477.
- [5] HUANG J, HU R, ROZELLE S, et al. Plant science: Insect-resistant GM rice in farmers' fields: Assessing productivity and health effects in China[J]. *Science*, 2005, 308: 688-690.
- [6] LIU Q, HALLERMAN E, PENG Y, et al. Development of Bt rice and Bt maize in China and their efficacy in target pest control [J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17: 1-15.
- [7] LI Y, HALLERMAN E M, LIU Q, et al. The development and status of Bt rice in China[J]. *Plant Biotechnol J*, 2016, 14: 839-848.
- [8] FELTON G W, SUMMERS C B. Antioxidant systems in insects [J]. *Arch Insect Biochem Physiol*, 1995, 29: 187-197.
- [9] DUBOVSKIY I M, MARTEM'YANOV V V, VORONTSOVA Y L, et al. Effect of bacterial infection on antioxidant activity and lipid peroxidation in the midgut of *Galleria mellonella* L. larvae (Lepidoptera, Pyralidae)[J]. *Comp Biochem Physiol - C Toxicol Pharmacol*, 2008, 148: 1-5.
- [10] MITTAPALLI O, NEAL J J, SHUKLE R H. Antioxidant defense response in a galling insect[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104: 1889-1894.
- [11] 吴学友. 转 Bt 基因稻谷对印度谷螟生长发育的影响及其机理研究[D]. 南京财经大学, 2013.
- [12] 林镇清, 郭谊, 郑志锐, 等. 稻谷储藏期间水分和脂肪酸值变化的研究[J]. *粮食储藏*, 2009, 38(3): 49-51+54.
- [13] 谢小波, 舒庆尧. 用 *Envirologix Cry1Ab/Cry1Ac* 试剂盒快速测定转基因水稻 Bt 杀虫蛋白含量的研究[J]. *中国农业科学*, 2001, 34(5): 465-468.
- [14] TU J M, DATTA K, ALAM M F, et al. Expression and function of a hybrid Bt toxin gene in transgenic rice conferring resistance to insect pest [J]. *Plant Biotechnology*, 1998, 15(4): 195-203.
- [15] TU J M, ZHANG G A, DATTA K, et al. Field performance of transgenic elite commercial hybrid rice expressing *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin[J]. *Nature Biotechnology*, 2000, 18(10): 1101-1104.
- [16] 姜永厚, 傅强, 程家安, 等. 转 Bt 基因水稻表达的毒蛋白 Cry1Ab 在害虫及其捕食者体内的积累动态[J]. *昆虫学报*, 2004, 47(4): 454-460.
- [17] 吴立成, 李啸风, 叶庆富, 等. 转 Cry1Ab 基因水稻中毒蛋白的表达、分泌及其在土壤中的残留[J]. *环境科学*, 2004, 25(5): 116-121.
- [18] BASHIR K, HUSNAIN T, FATIMA T, et al. Novel indica basmati line (B-370) expressing two unrelated genes of *Bacillus thuringiensis* is highly resistant to two lepidopteran insects in the field[J]. *Crop Protection*, 2005, 24(10): 870-879.
- [19] 陈浩. 三种 Bt 基因(Cry1Ac、Cry2A~*和 Cry9C~*)抗虫水稻的培育及评价[D]. 华中农业大学, 2005.
- [20] 赵文娟. 转 Bt 基因稻谷储藏期对四种储粮害虫的影响[D]. 西南大学, 2009.
- [21] 宋伟, 谢同平, 张美玲, 等. 应用电子鼻技术对梗稻谷中霉菌定量分析[J]. *粮食储藏*, 2011, 40(6): 34-38.
- [22] FRIDOVICH I. Oxygen is toxic[J]. *BioScience*, 1977, 27: 462-466.
- [23] 吴学友, 陈二虎, 王康旭, 等. 储藏期内转 Bt 基因稻谷对印度谷螟生长发育的影响[J/OL]. *粮油食品科技*: 1-8. <https://doi.org/10.16210/j.cnki.1007-7561.2020.06.011>.
- [24] 唐培安, 陶冶心, 康旭, 等. 转 Cry1Ab/Cry1Ac 基因大米粉饲喂印度谷螟后的比较转录组分析[J/OL]. *粮油食品科技*: 1-7. <https://doi.org/10.16210/j.cnki.1007-7561.2020.06.012>. 