

Biolog-Eco 方法检测转 *cry1Ab* 粳稻对褐飞虱肠道微生物多样性的影响

高秀云¹ 田俊策¹ 陈 洋¹ 胡 萃¹ 彭于发² 叶恭银^{1*}

(1. 浙江大学昆虫科学研究所, 杭州 310029; 2. 中国农业科学院植物保护研究所, 北京 100193)

摘要: 利用 Biolog-Eco 方法对以抗虫转 *cry1Ab* 基因粳稻(KMD1/KMD2)及其对照(秀水11)为食的褐飞虱肠道微生物群落多样性进行比较研究,以评价其对该飞虱肠道微生物多样性的影响。室内试验结果表明,褐飞虱以 KMD1 或 KMD2 为食持续 1、3、5 代后,其肠道微生物多样性指数(包括 Shannon、Simpson 和 McIntosh 指数)与对照无明显差异,但以 KMD1 为食时,其微生物群落的平均颜色变化率(AWCD)明显高于 KMD2 和对照。田间调查结果与室内试验基本相似。综合分析认为, KMD1 和 KMD2 对其非靶标害虫褐飞虱肠道微生物群落多样性无明显的负面影响。

关键词: Biolog-Eco 方法; 转 *cry1Ab* 粳稻; 褐飞虱; 肠道微生物; 多样性

Impact evaluation of transgenic *cry1Ab* japonica rice on the diversity of intestinal microbial community in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* using Biolog-Eco method

Gao Xiuyun¹ Tian Junce¹ Chen Yang¹ Hu Cui¹ Peng Yufa² Ye Gongyin^{1*}

(1. Institute of Insect Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310029, Zhejiang Province, China; 2. Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

Abstract: The diversity of intestinal microbial community in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* fed on transgenic *cry1Ab* rice (KMD1 and KMD2) or non-transgenic control (Xiushui 11) was compared using Biolog-Eco method to define the impacts of transgenic *cry1Ab* rice on the diversity of intestinal microbial community in the planthopper. Laboratory results showed that the diversity indexes including Shannon index, Simpson index and McIntosh index of the intestinal microbial community in the brown planthoppers fed on KMD1 and KMD2 for either of one, three or five generations were not significantly different from those fed on the control. In contrast, the average well color development (AWCD) of the intestinal microbial community in the brown planthoppers fed on KMD1 was markedly higher than that fed on either KMD2 or the control. As to the field test, the result was almost the same as that of the laboratory tests. In conclusion, it is suggested that impacts of both KMD1 and KMD2 on the diversity of the intestinal microbial community of non-target insect pest, *Nilaparvata lugens* were not significantly negative.

Key words: Biolog-Eco method; transgenic *cry1Ab* rice; *Nilaparvata lugens*; intestinal microorganism; diversity

20 世纪 90 年代以来,为有效控制水稻螟虫的危害,国内外相继开展并成功获得了一些抗虫转 Bt

基因水稻(Bt 水稻)种质或品系^[1],其中我国部分 Bt 水稻材料已进入生产性试验阶段,显示出良好的应

基金项目:国家重点基础研究发展“973”计划课题(2007CB109202),国家自然科学基金(30671377)

作者简介:高秀云,女,1984 年生,硕士研究生,研究方向为转基因作物生态安全评价, email: sdau.gxy@163.com

* 通讯作者(Author for correspondence), email: chu@zju.edu.cn; 收稿日期: 2008-04-03

用前景^[2-3]。同时,一些学者就 Bt 水稻对非靶标节肢动物和土壤微生物等的影响、基因漂移、靶标害虫抗性生态与食用安全性^[4]问题相继也作了不同程度的评价研究。就对非靶标害虫影响的评价,多关注于对其生物学与生态学特性的影响^[5-8],而对其体内肠道微生物的影响关注较少^[9-10]。目前,除有关抗除草剂油菜外源基因通过花粉水平转移至意大利蜜蜂 *Apis mellifera*、熊蜂 *Bombus terrestris* 和壁蜂 *Osmia bicornis* 肠道细菌的探讨^[11]外,尚乏对其它昆虫影响的报道,更鲜有关于 Bt 水稻的研究。为此,作者利用已广泛应用于根际或土壤微生物群落多样性研究的 Biolog-Eco 方法^[12-14],就 Bt 水稻对其非靶标害虫褐飞虱 *Nilaparvata lugens* 肠道微生物的影响开展研究,以探明 Bt 水稻是否会对其体内肠道微生物的活性及其多样性产生影响,为全面评价 Bt 水稻生态安全性提供信息参考。

1 材料与方法

1.1 供试水稻

供试 Bt 水稻为处于 R₁₅ 代的 2 个粳稻纯合品系,即 KMD1 和 KMD2。这 2 个品系源于 2 个独立的 R₀ 代转化株,均含有 *cry1Ab* 基因和玉米 Ubiquitin 启动子^[15],对照为其非转基因亲本品种秀水 11。供试水稻材料均播种于防虫网室内,并于约 30 日龄时移栽,以供室内试验。

1.2 室内试验

供试原始代褐飞虱取自本实验室在杂交水稻浙优 1 号上连续饲养的实验种群。分别置苗龄约为 60 天的 KMD1、KMD2 和秀水 11 上于控温控光的养虫室内继代饲养,饲养条件为:28℃、光周期(明:暗)14 h:10 h、光强度 3 500~4 000 lx。试验期间,分别于第 1、3、5 代随机取羽化 72 h 后的雌成虫供作肠道微生物分析。

1.3 田间试验

在浙江大学实验农场同一田块中设置 3 个小区,各小区分别于 2007 年 7 月 25 日单本插种 KMD1、KMD2 和对照秀水 11 (Xiushui 11),其中对照置于 2 个 Bt 水稻品系小区间。小区面积为 333.3 m²,小区间设有 1.5 m 的隔离田埂。整个生育期肥水管理按常规操作,但不施任何化学农药。在褐飞虱盛发的 9 月,分别于 10、20 和 30 日从各小区采集褐飞虱雌成虫。每小区每次随机 3 点取样,每样品取 50 头雌成虫,供肠道微生物检测。

1.4 取样与 Biolog 检测

随机取羽化 72 h 后的雌成虫 50 头,置 -20℃ 迅速冻死,75% 酒精体表消毒 3 min,再用 0.8% 生理盐水清洗。无菌状态下解剖取出肠道,以 0.8% 生理盐水清洗,收集至 1.5 mL 经消毒的 Eppendorf 离心管中,加 0.8% 生理盐水 200 μL,研磨匀浆,定容至 5 mL。最后,加样到 Biolog-Eco 微平板 (Biolog Inc., Hayward, CA) 上,每孔 120 μL,每样一板 (包括 3 个重复),将 Biolog 板置于 30℃ 恒温箱中培养,4 h 后用 Biolog 读数仪 (Biolog, Inc., Hayward, CA) 读数,此次读数设为初始值,之后每隔 24 h 读数 1 次,连续 7 天。具体参照 Classen 等^[16]的方法。

1.5 数据统计分析

肠道微生物代谢活性用每孔平均颜色变化率 AWCD (average well color development) 表示,计算方法^[17]为:

$$AWCD = [\sum (A - A_{CK})] / 31$$

其中:A 为每个碳源孔 590 nm 下的吸光度值减去 750 nm 下的吸光度值;A_{CK} 为对照孔的吸光度值。

利用各样品培养 96 h 的数据,计算其微生物群落多样性的 Shannon 指数 (*H'*)、Simpson 指数 (*1/D*) 和 McIntosh 指数 (*U*)。计算方法参照 Magurran^[18]:

$$H' = - \sum P_i \cdot \ln P_i$$

$$D = \sum \frac{n_i(n_i - 1)}{N(N - 1)}$$

$$U = \sqrt{\sum n_i^2}$$

其中:*P_i* 为第 *i* 孔的相对吸光值与整个平板相对吸光值总和的比率;*n_i* 是第 *i* 孔的相对吸光值;*N* 是相对吸光值总和。

数据分析采用 DPS 8.50 试验统计分析软件^[19]进行分析。

2 结果与分析

2.1 褐飞虱肠道微生物利用碳源的动力学特征

室内试验中,Bt 水稻品系 KMD1、KMD2 以及对照,其反映肠道微生物利用碳源量的重要指标 AWCD 均随培养时间延长呈逐渐增大的趋势,其中 72 h 前增长较迅速,此后逐渐趋于平稳。综合继代饲养 5 代的结果可知,以 KMD1 为食的褐飞虱肠道微生物 AWCD 明显高于以 KMD2 和对照为食,说明其肠道微生物利用碳源的能力相对较强。相比之

下,以 KMD2 为食的第 1、3 代褐飞虱肠道微生物 AWCD 在培养 72 h 后明显低于以对照为食,说明其利用碳源的能力相对较弱(图 1)。

田间试验中,Bt 水稻品系 KMD1、KMD2 及对照,其肠道微生物 AWCD 均随培养时间延长呈逐渐

增大的趋势,与室内试验结果相似。综合 3 次调查结果可知,以 KMD1 为食的褐飞虱肠道微生物 AWCD 明显高于以 KMD2 和对照为食,而 KMD2G 与对照间差异不显著(图 2)。

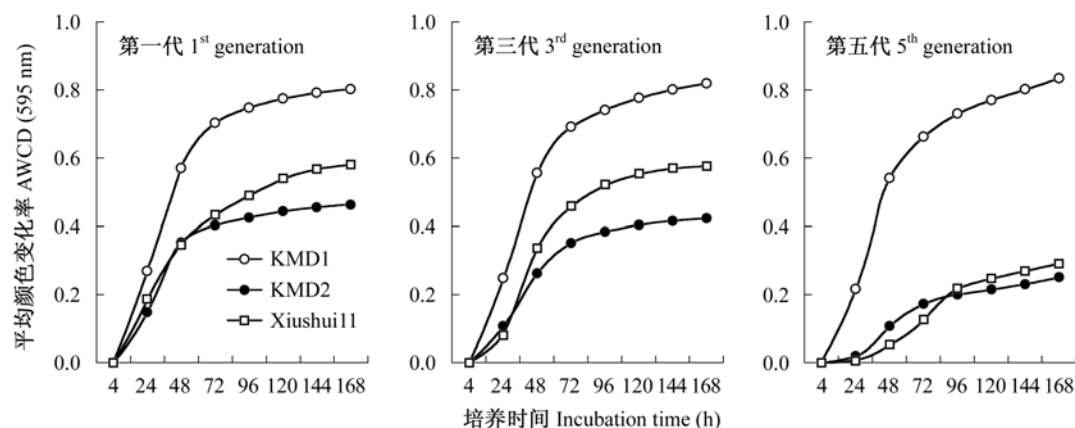


图 1 Bt 水稻和对照上室内连续饲养褐飞虱不同世代后其肠道微生物群落的 AWCD 变化曲线

Fig. 1 Average well color development (AWCD) variations curve of the intestinal microbial community of the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* reared with Bt rice (KMD1 and KMD2) and its non-transgenic control (Xiushui 11) for various generations under laboratory conditions

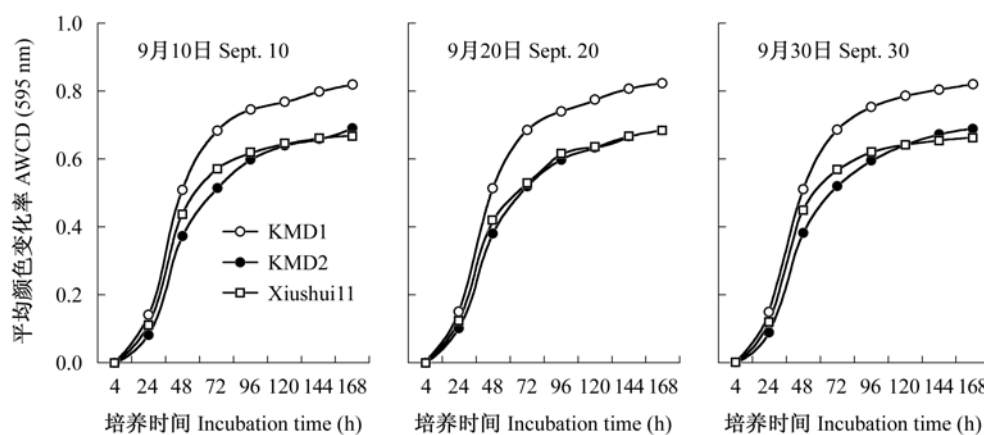


图 2 Bt 水稻和对照稻田中褐飞虱肠道微生物群落的 AWCD 变化曲线

Fig. 2 Average well color development (AWCD) variations curve of the intestinal microbial community of the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* in Bt (KMD1 and KMD2) and control (Xiushui 11) rice paddy fields

2.2 褐飞虱肠道微生物多样性指数分析

褐飞虱在室内于 Bt 水稻 (KMD1/KMD2) 上继代饲养 1、3、5 代后,其肠道微生物群落的 Shannon 和 Simpson 指数与对照相比均无显著差异,McIntosh 指数与对照无极显著差异(表 1)。可见,Bt 水稻对褐飞虱肠道微生物群落的物种丰富度、最常见物种的优势度和均匀度无明显影响。

田间调查中,Bt 水稻 (KMD1/KMD2) 对褐飞虱肠道微生物群落影响的结果与室内试验相仿(表

2),即对物种丰富度、最常见物种的优势度和均匀度均无明显影响。

3 讨论

昆虫肠道微生物与其消化、营养以及发育密切相关^[20]。因此,评价 Bt 水稻对非靶标害虫褐飞虱肠道微生物的影响,在一定程度也探明其对褐飞虱生物学的影响。本研究室内和田间的结果均表明,从 AWCD 动力学特征来看以 KMD1 为食的褐飞虱

表 1 Bt 水稻和对照上室内连续饲养褐飞虱不同世代后其肠道微生物群落的多样性指数分析

Table 1 Diversity indices of the intestinal microbial community of the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* reared with Bt rice (KMD1 and KMD2) and its non-transgenic control (Xiushui 11) for various generations under laboratory conditions

世代 Generation	供试材料 Genotype	多样性指数 Diversity indices		
		Shannon index	Simpson index	McIntosh index
第 1 代 First	KMD1	2.789 ± 0.113 a	54.951 ± 19.108 a	4.593 ± 0.747 abA
	KMD2	2.589 ± 0.187 a	84.462 ± 11.681 a	2.984 ± 1.105 abA
	Xiushui 11	2.928 ± 0.295 a	129.691 ± 114.942 a	3.603 ± 3.078 abA
第 3 代 Third	KMD1	2.849 ± 0.142 a	54.085 ± 11.660 a	5.756 ± 1.502 aA
	KMD2	2.418 ± 0.804 a	124.307 ± 133.412 a	3.485 ± 1.800 abA
	Xiushui 11	2.639 ± 0.399 a	95.441 ± 43.752 a	4.282 ± 1.653 abA
第 5 代 Fifth	KMD1	2.988 ± 0.241 a	132.544 ± 117.518 a	5.407 ± 0.984 abA
	KMD2	2.582 ± 0.766 a	36.893 ± 16.107 a	3.518 ± 1.286 abA
	Xiushui 11	2.954 ± 0.339 a	39.713 ± 24.398 a	2.209 ± 1.979 bA

注:表中数据为平均值 ± 标准差。同列中同一大、小写字母的数据间差异分别未达极显著 ($P < 0.01$) 和显著 ($P < 0.05$) 水平 (Duncan 氏新复极差多重比较)。表 2 同。Note: The data showed in the table were means ± standard deviation. Means followed by the same uppercase and lowercase letter in the same vertical row are not significantly different at $P < 0.01$ and $P < 0.05$, respectively, by Duncan's multiple rang test. The same for Table 2.

表 2 Bt 水稻和对照稻田中褐飞虱肠道微生物群落的多样性指数分析

Table 2 Diversity indices of the intestinal microbial community of the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* in Bt (KMD1 and KMD2) and control (Xiushui 11) rice paddy fields

取样时间(月-日) Sampled date (month-day)	供试材料 Genotype	多样性指数 Diversity indices		
		Shannon index	Simpson index	McIntosh index
9-10	KMD1	3.055 ± 0.071 a	42.728 ± 3.046 a	6.027 ± 0.529 a
	KMD2	2.807 ± 0.144 a	73.933 ± 27.811 a	5.977 ± 0.919 a
	Xiushui 11	2.534 ± 0.622 a	36.377 ± 13.582 a	5.220 ± 1.719 a
9-20	KMD1	3.155 ± 0.271 a	40.426 ± 4.020 a	6.226 ± 0.544 a
	KMD2	2.921 ± 0.168 a	70.678 ± 27.566 a	6.022 ± 1.214 a
	Xiushui 11	2.614 ± 0.322 a	34.868 ± 14.784 a	5.622 ± 1.728 a
9-30	KMD1	3.068 ± 0.056 a	42.899 ± 3.604 a	6.122 ± 0.548 a
	KMD2	2.860 ± 0.144 a	72.411 ± 28.548 a	5.862 ± 1.028 a
	Xiushui 11	2.628 ± 0.544 a	35.766 ± 16.004 a	5.834 ± 1.821 a

肠道微生物的生理活性显著高于以 KMD2 和对照为食。这可能与褐飞虱在 KMD1 上排泄蜜露少或取食少有关^[21],即肠道微生物生理活性的提高或许能弥补取食少而造成营养不良的缺陷,这尚待验证。从褐飞虱肠道微生物的 Shannon、Simpson、McIntosh 多样性指数综合分析可知,Bt 水稻(KMD1/KMD2)对褐飞虱肠道微生物多样性无明显影响。这与田间调查中,其对褐飞虱种群密度无显著影响的结果^[22]

一致。此外,褐飞虱肠道微生物群落的种类,还有待通过分离培养并结合分子标记检测等方法来确定。

就转基因作物对非靶标生物体内肠道微生物的影响,国际上较关注外源基因是否有水平转移到微生物基因组中的可能性^[9-10]。有关抗除草剂油菜外源基因(*pat*)通过花粉水平转移至意大利蜜蜂、熊蜂和壁蜂肠道细菌的研究表明,在这 3 种蜂肠道细菌基因组中未检测到*pat*基因,即这种基因的水平

转移风险是可忽略的^[11]。本研究供试 Bt 水稻中的 *cryIAb* 基因是否可能存在于褐飞虱的肠道细菌中还有待检测明确。

参 考 文 献 (References)

- [1] High S M, Cohen M B, Shu Q Y, et al. Achieving successful deployment of Bt rice. Trends in Plant Science, 2004, 9(6): 286 – 292
- [2] Huang J K, Hu R F, Rozelle S, et al. Genetically modified rice, yields, and pesticides: assessing farm-level productivity effects in China. Economic Development and Cultural Change, 2008, 56(2): 241 – 263
- [3] Wang Y Q, Johnston S. The status of GM rice R&D in China. Nature Biotechnology, 2007, 25(7): 717 – 718
- [4] Chen M, Zhao J Z, Ye G Y, et al. Impact of insect-resistant transgenic rice on target insect pests and non-target arthropods in China. Insect Science, 2006, 13(6): 409 – 420
- [5] 陈茂, 叶恭银, 胡萃, 等. Bt 籼稻对褐飞虱取食、产卵行为的影响. 植物保护学报, 2003, 30(4): 365 – 370
- [6] 陈茂, 叶恭银, 姚洪渭, 等. 抗虫转基因水稻对非靶标害虫褐飞虱取食与产卵行为影响的评价. 中国农业科学, 2004, 37(2): 222 – 226
- [7] Chen M, Ye G Y, Liu Z C, et al. Field assessment of the effects of transgenic rice expressing a fused gene of *cryIAb* and *cryIAc* from *Bacillus thuringiensis* Berliner on nontarget planthopper and leafhopper populations. Environmental Entomology, 2006, 35(1): 127 – 134
- [8] Bernal C C, Aguda R M, Cohen M B. Effect of lines transformed with *Bacillus thuringiensis* toxin genes on the brown planthopper and its predator *Cyrtorhinus lividipennis*. Entomologia Experimentalis et Applicata, 2002, 102: 21 – 28
- [9] Vires J, de Wackernagel W. Microbial horizontal gene transfer and the DNA release from transgenic crop plants. Plant Soil, 2004, 266(1/2): 91 – 104
- [10] Nielsen K M, Townsend J P. Monitoring and modeling horizontal gene transfer. Nature Biotechnology, 2004, 22(9): 1110 – 1114
- [11] Mohr K I, Tebbe C C. Field study results on the probability and risk of a horizontal gene transfer from transgenic herbicide-resistant oilseed rape pollen to gut bacteria of bees. Applied Molecular and Biotechnology, 2007, 75(3): 573 – 583
- [12] Preston-Mafham J, Boddy L, Randerson P F. Analysis of microbial community functional diversity using sole-carbon-source utilisation profiles-a critique. FEMS Microbiology Ecology, 2002, 42: 1 – 14
- [13] Konopka A, Oliver L, Turco R F. The use of carbon substrate utilization patterns in environmental and ecological microbiology. Microbial Ecology, 1998, 35(2): 103 – 115
- [14] 郑华, 欧阳志云, 方治国, 等. BIOLOG 在土壤微生物群落功能多样性研究中的应用. 土壤学报, 2004, 41(3): 456 – 461
- [15] Cheng X Y, Sardana R, Kaplan H, et al. *Agrobacterium*-transformed rice plants expressing synthetic *cryIA(b)* and *cryIA(c)* genes are highly toxic to striped stem borer and yellow stem borer. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1998, 95(6): 2767 – 2772
- [16] Classen A T, Boyle S I, Haskins K E, et al. Community-level physiological profiles of bacteria and fungi: plate type and incubation temperature influences on contrasting soils. FEMS Microbiology Ecology, 2003, 44(3): 319 – 328
- [17] Grove J A, Kautola H, Javadpour S, et al. Assessment of changes in the microorganism community in a biofilter. Biochemical Engineering Journal, 2004, 18(2): 111 – 114
- [18] Magurran A E. Ecological diversity and its measurement. New Jersey: Princeton University Press, 1988: 43 – 47
- [19] 唐启义, 冯明光. DPS® 数据处理系统: 实验设计、统计分析 & 数据挖掘. 北京: 科学出版社, 2007
- [20] Dillon R J, Dillon V M. The gut bacteria of insects: nonpathogenic interactions. Annual Review of Entomology, 2004, 49: 71 – 92
- [21] 陈茂. 转基因抗虫、抗病毒水稻对非靶标生物的生态安全性评价. 浙江大学博士学位论文, 2005: 33 – 46
- [22] Chen M, Liu Z C, Ye G Y, et al. Impacts of transgenic *cryIAb* rice on non-target planthoppers and their main predator *Cyrtorhinus lividipennis* (Hemiptera: Miridae) - a case study of the compatibility of Bt rice with biological control. Biological Control, 2007, 42(2): 242 – 250