

土壤中的 Cd 对抗虫转基因水稻种植的影响

钟言欣¹, 刘 燕², 李 磊³, 秦红益¹, 韩 成³, 刘 标⁴

(1. 南京师范大学中北学院, 江苏 丹阳 212332)

(2. 苏州市百信环境检测工程技术有限公司, 江苏 苏州 215101)

(3. 南京师范大学地理科学学院, 江苏 南京 210023)

(4. 生态环境部南京环境科学研究所, 江苏 南京 210042)

[摘要] 外源抗虫基因转入有利于作物减少药肥施用、降低虫害,其环境适应性研究具有生态学意义。当前,抗虫转基因作物对重金属胁迫的适应潜力尚不清楚。本研究以抗虫转基因水稻(HH1)及其非转基因亲本水稻(MH63)为研究对象,设置添加量分别为0、3.5、60和240 mg·kg⁻¹的土壤Cd(II)胁迫进行水稻盆栽实验,测定水稻分蘖期和成熟期农艺性状、各植株器官Cd含量、水稻根系氧化酶系活性和根际土壤理化性质。结果显示,与Cd₀相比,Cd₂₄₀处理下HH1与MH63水稻株高分别降低35%、46%;地上生物量分别降低59%、73%;产量分别降低55%、85%。Cd胁迫能明显降低水稻株高、生物量及产量。相同Cd胁迫下,HH1水稻的株高、生物量及产量高于MH63水稻,说明外源Bt基因的转入能够提高水稻对Cd胁迫的抗性。外源Bt基因的转入没有改变Cd在水稻中的积累模式,但是相同Cd胁迫下,HH1水稻各器官中Cd含量高于MH63水稻。丙二醛(MDA)含量结果表明,分蘖期HH1水稻具有比MH63水稻更好的抗Cd能力,而成熟期则相反。其原因可能与植株器官Cd含量、根系微环境、解毒酶系统有关。综上所述,Cd胁迫与外源基因转入会对水稻农艺性状及各器官Cd富集产生影响,分蘖期HH1水稻具有比MH63水稻更强的抗Cd能力。

[关键词] 转基因水稻, 镉胁迫, 氧化酶系活性, Cd富集

[中图分类号] X173 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1001-4616(2023)02-0140-09

Effect of Soil Cd on Insect-Resistant Transgenic Rice Planting

Zhong Yanxin¹, Liu Yan², Li Lei³, Qin Hongyi¹, Han Cheng³, Liu Biao⁴

(1. Zhongbei College, Nanjing Normal University, Danyang 212332, China)

(2. Suzhou Baixin Environmental Testing Engineering Technology Company Limited, Suzhou 215101, China)

(3. School of Geography, Nanjing Normal University, Nanjing 210023, China)

(4. Nanjing Institute of Environmental Science, Ministry of Ecology and Environment, Nanjing 210042, China)

Abstract: The modification of insect-resistant gene is conducive to reduce insect pests and decrease pesticide and fertilizer application. Thus, the research on environmental adaptability of insect-resistant transgenic crops has important ecological significance. However, the adaptation potential of insect-resistant transgenic crops to heavy metal stress remains unclear. In this study, insect-resistant transgenic rice Huahui 1 (HH1) and its non-transgenic parent rice Minghui 63 (MH63) are selected for a pot experiment, and the soil Cd (II) concentrations are set as 0, 3.5, 60 and 240 mg·kg⁻¹, respectively. The agronomic traits, Cd content in plant organs, enzyme activity of rice roots and leaves, as well as physical and chemical properties of rhizosphere soil, are determined at tillering stage and maturity stage. The results show that compared with Cd₀, the plant height of HH1 and MH63 rice under Cd₂₄₀ treatment decrease by 35% and 46%, respectively. Their aboveground biomass decrease by 59% and 73% respectively, and their yield is reduced by 55% and 85%, respectively. Cd stress can significantly reduce plant height, biomass and yield of rice. Under the same Cd stress, the plant height, biomass and yield of HH1 rice are higher than those of MH63 rice, which indicate that the modification of exogenous Bt gene could improve the resistance of rice to Cd stress. The modification of exogenous Bt gene don't change the accumulation pattern of Cd in rice, however, under the same Cd stress, the Cd content in each organs of HH1

收稿日期: 2022-11-13.

基金项目: 农业部转基因生物新品种培育重大专项(2016ZX08012005)、国家自然科学基金项目(42077033).

通讯作者: 秦红益, 博士, 讲师, 研究方向: 环境微生物学研究. E-mail: qinhongyi@163.com

rice is higher than that of MH63 rice. The results of malondialdehyde(MDA) content showed that HH1 rice have better Cd resistance than MH63 rice at tillering stage, and the opposite was at maturity stage. The reason might be related to Cd concentration in plant organs, root microenvironment and detoxification enzyme system. In conclusion, Cd stress and exogenous gene modification affect rice agronomic traits and Cd enrichment in plant organs. Moreover, HH1 rice at tillering stage have stronger Cd resistance than MH63 rice.

Key words: insect-resistant transgenic rice, cadmium stress, oxidase activity, Cd accumulation

火山爆发、灰尘、基岩风化等自然现象,以及金属加工业、矿产业、污水灌溉等人类活动可造成土壤 Cd 污染. 我国受 Cd 污染的耕地面积约为 $1.33 \times 10^4 \text{ hm}^2$, 表层土壤中(0~20 cm) Cd 的背景含量异质性较高, 范围为 $0.001 \sim 13.430 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ [1]. Cd 是作物生长发育非必需元素, 过量存在时具有生物毒性, 会降低农作物的品质与产量; 同时, Cd 会随食物链富集, 易被人体吸收累积, 对人体的毒性极高 [2-3]. 水稻是世界近一半人口的主要粮食作物, 也是我国第一大粮食作物, 同时也是极易吸收富集 Cd 的作物. 植物对重金属产生适应的主要方式有两种: 一是通过分泌物改变根系环境条件. 根系分泌物如羧化物、苹果酸、柠檬酸、草酸等有机酸类物质能降低重金属毒害 [4-5], 根系微生物也会发生变化 [6]. 二是通过植物本身抗氧化酶系统发挥重金属解毒作用 [7-8]. 当植物处于轻度胁迫时, 植株体内的活性氧含量较少, 抗氧化酶系统互相协调保持植物体的正常生理代谢活动. 然而严重胁迫环境可能会摧毁整个抗氧化酶系统, 严重危害植物生长甚至导致植株死亡 [9].

外源 Bt 基因的转入可以降低作物遭受害虫的危害, 有利于作物实现其产量潜力的同时也保护了自然环境, 对抗虫转基因作物的研究具有重要的生态学意义. 外源 Bt 基因转入后, 棉花和玉米等作物的株高、分蘖数等农艺性状会发生改变. 例如, Mungai 等 [10] 研究者表明在欧洲玉米螟危害严重情况下, 抗虫转基因杂交玉米的产量比非转基因杂交品种提高了 12%~13%. 在鳞翅目害虫胁迫下, 抗虫转基因水稻的产量比非转基因亲本更高 [11]. 也有研究显示在低虫害胁迫下抗虫转基因水稻产量有所降低 [12]. 到目前为止, 对抗虫转基因水稻的研究主要集中在抗虫转基因材料的培育以及抗虫转基因作物种植的生态环境影响 [13-14], 抗虫转基因水稻对 Cd 胁迫的响应罕见报道, 外源基因的转入是否会改变 Cd 在水稻内的积累模式目前尚不清楚.

由此, 本研究以抗虫转基因水稻及其非转基因亲本为研究材料, 设置 Cd(II) 添加量分别为 0、3.5、60 和 $240 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 进行水稻盆栽实验. $3.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 为我国高 Cd 背景地区土壤重金属污染平均值; $60 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 为对作物生长有明显危害的土壤 Cd 污染浓度; $240 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 为土壤污染的极端浓度, 可用于探究水稻的抗 Cd 潜力. 通过监测水稻生长株高、生物量、产量等农艺性状, 测定分蘖期与成熟期水稻根际土壤理化性质, 水稻根、茎、叶、籽粒等各器官 Cd 富集量, 并从水稻根际土壤理化性质和水稻抗氧化酶系统角度研究两种水稻的抗 Cd 机制, 研究可为 Cd 胁迫对抗虫转基因水稻的影响提供实验数据, 也为抗虫转基因水稻的生态环境安全提供理论依据.

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 水稻种子、育苗及其鉴定

本实验供试水稻品种为抗虫转基因水稻华恢 1 号(HH1)及其非转基因亲本水稻明恢 63(MH63). 水稻种子经 10% H_2O_2 溶液浸泡杀菌、去离子水清洗后备用. 杀菌后的种子置于饱和水的滤纸上, 并于 28 °C 条件下避光培养 3 天后, 均匀撒在装有营养土的育秧盆里进行水稻育苗. 水稻出苗约 10 天时, 挑取 HH1 和 MH63 水稻子叶尖部, 采用农业农村部 953 号公告指定的定性 PCR 方法和 EnviroLogix QuickStick 试剂盒分别对水稻品种进行 PCR 及 Cry 蛋白试纸条鉴定 [15]. 检测结果明确 HH1 水稻经转 *cry1Ab/c* 基因修饰, MH63 水稻叶片中未检测到 Bt 蛋白.

1.1.2 盆栽土壤及其预处理

盆栽试验土壤采集于南京师范大学仙林校区荒山林地内(118°55'E, 32°06'N), 清理地表枯枝落叶后, 采集表层土壤(0~15 cm), 经实验室内研磨过 2 mm 孔径筛网, 混匀备用. 供试土壤 pH 值为 7.77, 总氮含

量为 $0.41 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 总有机氮含量为 $27.3 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 未检测到 $\text{Cd}(\text{II})$ 。

1.2 水稻盆栽试验设置及样品采集

水稻盆栽试验共设置3个不同Cd浓度胁迫处理: $\text{Cd}_{3.5}$ 、 Cd_{60} 和 Cd_{240} ,其Cd(II)添加量(形态为 $\text{CdCl}_2 \cdot (2.5\text{H}_2\text{O})$)分别为3.5、60和240 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。试验设置不添加Cd处理(Cd_0)作为对照。每个处理设置4个重复。盆栽实验容器为PVC材质,规格为 $\phi 250 \text{ mm} \times 150 \text{ mm}$ 。每桶加入5.0 kg干土当量的供试土壤,淹水高度5 cm,按处理设置添加Cd浓度梯度后稳定30天,期间覆盖扎有小孔的保鲜膜保水通气。稳定结束后,播撒适量复合肥作基肥(施用量为 $1.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)。将20天苗龄HH1和MH63稻秧分别按2株1穴完成移栽,记为0天。第12天补充尿素(施用量为 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$),第50~57天为水稻分蘖后期排水晾田。

在水稻生长的分蘖期(移栽后45天)与成熟期(移栽后110天)进行破坏性采样,采集水稻植株和水稻根际土壤。采用抖落法采集水稻根际土壤样品^[16-17],混匀后于4℃保存待分析。

1.3 土壤理化性质测定

土壤pH按照土水比1:2.5(w/v)振荡均匀后取上清液进行测定。采用 $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的KCl浸提土壤,滤液中无机氮含量用流动分析仪(Skalar, Breda, Netherlands)测定。土壤经风干过100目筛后,采用凯氏定氮法和 $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 氧化法分别测定土壤中的总氮(TN)和总有机碳(TOC)含量。土壤有效磷(AP)以氟化铵、盐酸为浸提剂,由钼锑抗比色法测定^[17-18]。采用联合浸提-火焰原子吸收分光光度计测定吸光值,计算土壤有效态Cd含量^[19]。

1.4 水稻农艺性状测定

水稻移栽后每隔7天测定水稻株高。分蘖期及成熟期破坏性采集的水稻植株的根、茎、叶等器官在干燥箱中经105℃杀青15 min,再于70℃烘干后分别称重获得生物量干重,三者相加为成熟期地上部分生物量。成熟期水稻手工脱粒后,采用水漂法根据浮沉状态区分空秕粒和饱粒,后者经风干称量,计算水稻产量^[20]。

1.5 水稻各器官Cd含量测定

称取适量的水稻根、茎、叶或籽粒样品置于消煮管中,加入5 mL浓 HNO_3 ,摇匀后,使用保鲜膜将消煮管管口封好,浸泡过夜。再加入3 mL浓 HNO_3 ,盖好后,在低温消煮炉上,在200℃下加热直至消煮管内溶液体积剩大约4 mL(约需2~3 h)时再加入0.5 mL H_2O_2 和1 mL HClO_4 ,消煮1.5~2 h后把盖子拿掉,煮至近干。加入3 mL $0.32 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HNO_3 ,若此时溶液澄清透明则直接用 $0.32 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HNO_3 在离心管中定容到10 mL,待测定;若仍是黄色,则可加入适量 H_2O_2 和 HClO_4 ,加热至溶液清亮为止,最后蒸发至近干,再用 $0.32 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HNO_3 定容到10 mL,过滤后使用ICP-AES(Spectro, Germany)测定^[21]。

1.6 水稻根系氧化酶系活性测定

对分蘖期与成熟期的水稻根系及叶片中的酶系活性,采用上海索桥生物试剂盒提取测定。提取的过氧化氢酶(CAT)由紫外分光光度法于240 nm波长处测定,过氧化物酶(POD)与超氧化物歧化酶(SOD)由可见分光光度法分别于470 nm、560 nm波长处测定,丙二醛(MDA)含量由532 nm与600 nm的吸光度差值确定。

1.7 数据统计分析

本实验采用统计软件SPSS 16.0对数据进行分析统计。采用单因素方差分析(ANOVA)比较不同处理间是否具有统计学差异($P < 0.05$, $n = 4$, Turkey's test),采用独立样本T检验比较HH1和MH63水稻间的显著差异($P < 0.05$, $n = 4$),采用双因素方差分析不同浓度Cd胁迫和水稻品种对水稻农艺性状、土壤理化性质的影响。图表制作采用Origin 8.0和Adobe Illustrator CS6软件。

2 结果与分析

2.1 水稻生长情况及其农艺性状

不同浓度Cd胁迫影响了水稻生长期内株高,转基因水稻HH1和非转基因亲本水稻MH63对Cd胁迫的响应不同(图1)。不同Cd胁迫处理下的HH1和MH63在移栽后的第11~12周达到生长期的株高最大值(图1a和图1b)。HH1水稻经 Cd_0 、 $\text{Cd}_{3.5}$ 、 Cd_{60} 和 Cd_{240} 处理的株高最大值分别为128.5、129.0、117.5和

95.0 cm,而对应处理的 MH63 水稻株高最大值分别为 122.5、128.0、103.8 和 83.0 cm. 可见,水稻株高最大值随 Cd 浓度增加呈下降趋势. Cd₀ 与 Cd₂₄₀处理下,从水稻生长的第 4 周开始到 15 周 HH1 水稻的株高显著高于 MH63 水稻($P<0.05$);Cd_{3.5}处理下,在水稻生长的第 4、6、8 周 HH1 水稻的株高显著高于 MH63; Cd₆₀处理下,从水稻生长的第 3 周开始到 15 周 HH1 水稻的株高显著高于 MH63 水稻. 可见,在相同 Cd 浓度胁迫下,HH1 水稻的株高总体上高于 MH63 水稻(图 1a 和图 1b). HH1 水稻分蘖期叶片 Bt 蛋白含量结果表明,Cd 胁迫能显著影响抗虫转基因水稻叶片 Bt 蛋白表达量;与 Cd₀ 处理相比,Cd_{3.5}、Cd₆₀ 和 Cd₂₄₀处理的 Bt 蛋白含量分别降低了 9%、33%和 17%(图 1c). 不同 Cd 浓度处理的 MH63 水稻叶片中均未检测到 Bt 蛋白. 相比于 Cd₀、Cd_{3.5} 和 Cd₆₀处理,Cd₂₄₀处理显著降低了 HH1 与 MH63 水稻分蘖期地上部分和地下部分生物量(图 1d). 成熟期,Cd₆₀与 Cd₂₄₀处理的 HH1 水稻地上部分生物量显著低于 Cd₀ 和 Cd_{3.5}处理的;Cd₂₄₀处理的 MH63 水稻地上部分生物量显著低于 Cd₀ 处理的;Cd₂₄₀处理下,HH1 水稻成熟期地上部分生物量显著高于 MH63 水稻,而其余 Cd 胁迫处理下两种水稻生物量无显著差异. 不同 Cd 胁迫没有影响 HH1 水稻成熟期地下部分生物量,而 Cd₆₀与 Cd₂₄₀处理的 MH63 水稻成熟期地下部分生物量显著低于 Cd₀ 和 Cd_{3.5}处理的. 中高量 Cd 胁迫显著影响了水稻产量,且两种水稻产量对 Cd 胁迫的响应不同. Cd₂₄₀处理显著降低了 HH1 和 MH63 水稻产量,Cd₆₀处理显著降低了 MH63 水稻产量. Cd₀ 和 Cd_{3.5}处理下,HH1 水稻产量比 MH63 水稻产量低,但无显著差异(图 1e). 本研究中 Cd₆₀与 Cd₂₄₀处理下,HH1 水稻产量显著高于 MH63 水稻(图 1e),说明 Bt 基因转入增加了植物对高浓度 Cd 污染的抗性.

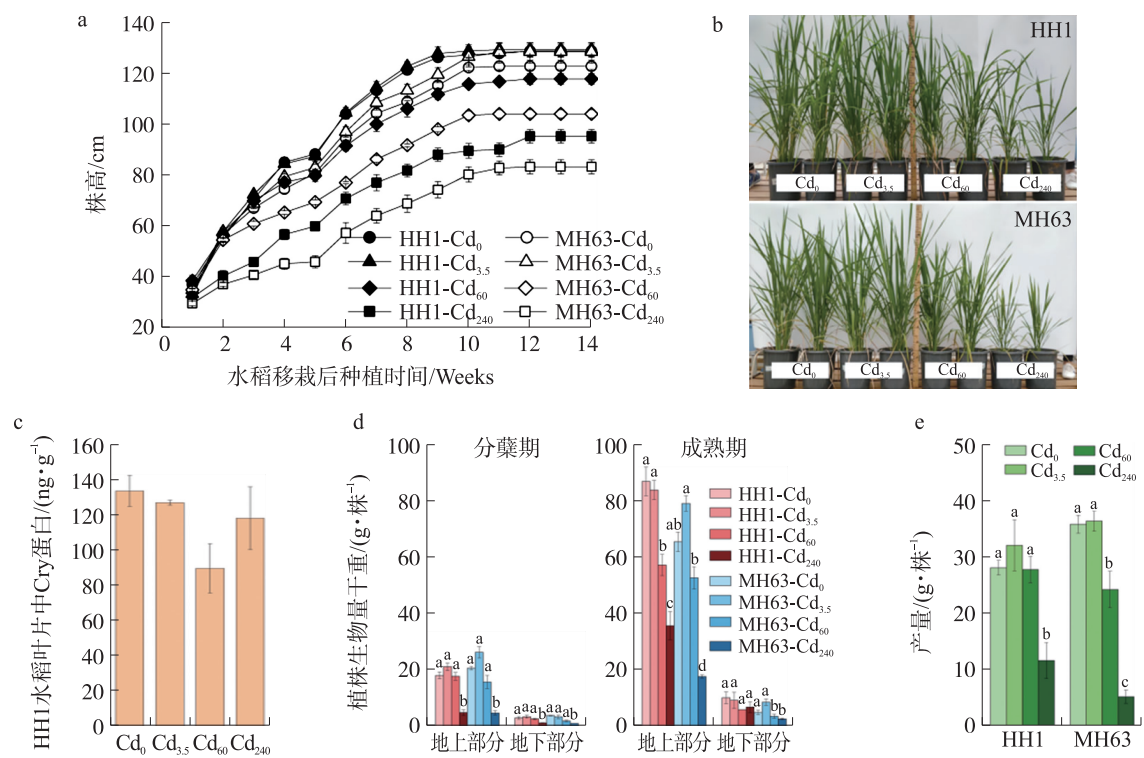


图 1 水稻生长情况及其农艺性状(图 d 和图 e 中不同字母代表的是不同 Cd 胁迫处理间的显著差异)

Fig. 1 Growth and agronomic characters of rice(Different letters indicate the significant difference among different Cd stress treatments in figure d and e)

2.2 水稻植株各部位 Cd 富集量

Cd₀ 处理下,分蘖期和成熟期 HH1 和 MH63 水稻根、茎、叶中均未检测到 Cd(II). Cd_{3.5}处理下,两种水稻茎、叶、籽粒中均未检测到 Cd(II),而根中检测到 Cd(II)(图 2a);Cd₆₀和 Cd₂₄₀处理下,水稻分蘖期和成熟期根系 Cd 富集量显著高于茎、叶和籽粒. HH1 和 MH63 水稻分蘖期根系 Cd(II)浓度均随着 Cd 胁迫增强而上升,在 Cd₆₀处理下分别达到 228 和 232 μg·g⁻¹,在 Cd₂₄₀处理下分别达到 626 和 740 μg·g⁻¹,且两种水稻根系 Cd(II)浓度间无显著差异. HH1 和 MH63 水稻成熟期根系 Cd(II)富集规律与分蘖期一致. Cd₆₀和 Cd₂₄₀处理下,HH1 和 MH63 水稻籽粒中 Cd(II)含量无显著差异,且 Cd₆₀和 Cd₂₄₀处理间无显著差异;

Cd₆₀处理下,HH1 和 MH63 水稻籽粒中 Cd(II) 含量分别为 8.95 和 7.34 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$;Cd₂₄₀处理下,HH1 和 MH63 水稻籽粒中 Cd(II) 含量分别为 7.68 和 7.99 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (图 2a). 本研究结果显示,水稻成熟期时,HH1 和 MH63 水稻中各器官 Cd 分配规律都是根>茎叶>谷粒,且 Cd₆₀处理的根与 Cd₂₄₀处理的茎中 HH1 水稻的 Cd 总量均高于 MH63(图 2a). Cd₆₀和 Cd₂₄₀处理下两种水稻植株总 Cd(II) 含量显著高于 Cd_{3.5}处理,但 Cd₆₀和 Cd₂₄₀处理间无显著差异(图 2b). Cd_{3.5}、Cd₆₀和 Cd₂₄₀处理下,HH1 水稻分蘖期植株总 Cd(II) 含量分别为 0.015、0.41 和 0.63 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$,成熟期分别为 0.067、1.37 和 2.80 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$;MH63 水稻分蘖期植株总 Cd(II) 含量分别为 0.014、0.29 和 0.38 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$,成熟期分别为 0.070、1.13 和 1.26 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. 其中,Cd₂₄₀处理的 HH1 水稻植株总 Cd(II) 含量显著高于 MH63,其余处理下 HH1 和 MH63 水稻间无显著差异(图 2b).

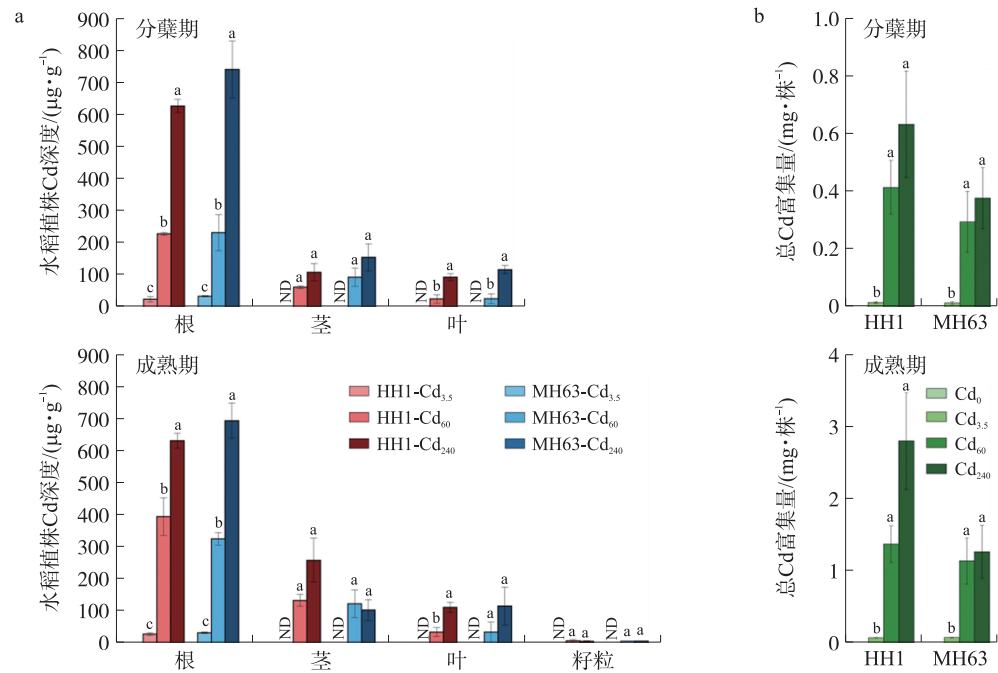


图 2 水稻植株各部位 Cd 浓度及总 Cd 富集量(不同字母代表的是不同 Cd 胁迫处理间的显著差异;ND 表示未检测到)

Fig. 2 Cd concentration and accumulation in different parts of rice plants(Different letters indicate the significant difference among different Cd stress treatments;ND indicate never detected)

2.3 水稻根际土壤理化性质

分蘖期时,不同 Cd 浓度胁迫下 HH1 水稻根际土壤 pH、NH₄⁺-N 与 AP 含量差异显著(表 1). 与 Cd₀ 相比,Cd_{3.5}、Cd₆₀和 Cd₂₄₀处理的 pH 显著升高,Cd₂₄₀处理的 AP 含量显著升高. 不同 Cd 胁迫下 MH63 水稻根际土壤 pH、NH₄⁺-N、AP 也差异显著. 与 Cd₀ 处理相比,Cd_{3.5}与 Cd₆₀处理的 pH 显著升高,Cd_{3.5}处理下 NH₄⁺-N 含量显著降低,同时 Cd₂₄₀处理下 AP 含量显著升高. Cd₂₄₀处理下,HH1 水稻的根际土壤 pH 显著高于 MH63 水稻,Cd_{3.5}胁迫下 MH63 水稻根际土壤中 NH₄⁺-N 含量明显低于 HH1 水稻. 分蘖期水稻根际土壤 pH 值与水稻品种、Cd 浓度及其交互影响存在显著关系,而根际土壤 NH₄⁺-N、AP 与有效 Cd 含量仅与 Cd 浓度存在显著关系(表 1). 成熟期时,与 Cd₀ 处理相比,Cd_{3.5}、Cd₆₀和 Cd₂₄₀处理下 HH1 水稻根际土壤 pH 值显著增加,Cd₂₄₀处理下根际土壤中 TN 含量显著增加而根际土壤 TOC 值显著下降. 与 Cd₀ 相比,Cd_{3.5}、Cd₆₀和 Cd₂₄₀处理下 MH63 水稻根际土壤 pH 值显著下降,Cd₂₄₀处理下根际土壤 TN 含量显著升高. Cd₀、Cd_{3.5}、Cd₆₀和 Cd₂₄₀处理下 HH1 水稻的 pH 值均显著高于 MH63 水稻. Cd₂₄₀处理下 HH1 水稻根际土壤的 TOC 含量显著低于 MH63 水稻(表 1). 成熟期水稻根际土壤 pH 值受水稻品种及其与 Cd 浓度的交互作用影响显著,水稻根际土壤的 TOC 含量明显受到 Cd 浓度胁迫独立影响及 Cd 浓度胁迫与水稻品种的交互影响,根际土壤 TN 值仅受 Cd 浓度胁迫的影响,根际土壤 AP 值受水稻品种影响(表 1).

可见,Cd 胁迫提高了水稻根际土壤 TN 值、AP 值及有效 Cd 的含量;相比于 MH63,种植 HH1 水稻的根际土壤 pH 值与 AP 值显著降低.

表 1 水稻分蘖期和成熟期根际土壤理化性质

Table 1 The physical and chemical properties of rhizosphere soil at tillering and maturity stage of rise

	Cd 胁迫 处理	水稻 品种	pH	TN /(g·kg ⁻¹)	NH ₄ ⁺ -N /(mg·kg ⁻¹)	TOC /(g·kg ⁻¹)	AP /(mg·kg ⁻¹)	Cd(II) /(mg·kg ⁻¹)
分蘖期	Cd ₀	HH1	6.28±0.01c	0.46±0.01a	9.13±0.41ab	3.93±0.04a	4.14±0.43b	ND
		MH63	6.24±0.01cd	0.42±0.01a	9.48±0.28a	3.85±0.08a	4.37±0.20b	ND
	Cd _{3.5}	HH1	6.45±0.06ab	0.47±0.02a	7.71±0.09a	3.52±0.12a	5.59±0.80b	ND
		MH63	6.58±0.03b	0.49±0.01a	7.31±0.31c	3.80±0.21a	6.17±0.06b	ND
	Cd ₆₀	HH1	6.55±0.01a	0.44±0.04a	9.50±0.40a	3.75±0.16a	5.29±0.34b	24.70±8.58b
		MH63	6.62±0.00ab	0.54±0.06a	9.28±0.95ab	5.34±1.06a	5.95±1.20b	25.70±6.73b
	Cd ₂₄₀	HH1	6.54±0.03ab	0.49±0.00a	9.77±0.81a	3.91±0.09a	10.30±0.70a	66.40±7.77ab
		MH63	6.10±0.01d	0.54±0.03a	10.60±0.70a	3.70±0.03a	11.70±0.03a	93.80±21.20a
成熟期	Cd ₀	HH1	6.42±0.01b	0.42±0.02b	3.41±0.06a	3.73±0.07a	17.00±0.61ab	ND
		MH63	6.85±0.01a	0.44±0.00b	4.02±0.27a	3.63±0.06ab	14.40±3.08b	ND
	Cd _{3.5}	HH1	6.47±0.02a	0.48±0.04ab	3.29±0.22a	3.88±0.02a	18.80±0.28ab	ND
		MH63	6.81±0.06b	0.44±0.03b	4.25±0.34a	3.75±0.04a	12.00±0.41b	ND
	Cd ₆₀	HH1	6.45±0.03a	0.58±0.06ab	3.63±0.27a	4.17±0.20a	21.20±0.22ab	33.00±1.78b
		MH63	6.83±0.04b	0.55±0.03ab	4.13±0.11a	3.77±0.04a	16.60±0.45ab	34.60±0.92b
	Cd ₂₄₀	HH1	6.55±0.03a	0.65±0.01a	4.74±0.91a	3.08±0.25b	26.00±2.18a	218.00±9.27a
		MH63	6.72±0.05b	0.65±0.04a	4.23±0.23a	3.79±0.15a	17.00±1.88ab	192.00±6.76a
双因素方差分析			<i>F</i>					
分蘖期	Cd 胁迫处理		43.449 ***	2.867	20.228 ***	1.976	47.451 ***	19.201 **
	水稻品种		51.955 ***	2.730	0.367	1.989	1.001	1.283
	Cd 胁迫处理×水稻品种		15.970 ***	2.040	1.315	2.216	0.937	1.109
成熟期	Cd 胁迫处理		0.040	19.360 ***	1.692	5.921 **	3.622	861.232 ***
	水稻品种		21.740 ***	0.192	2.027	0.052	13.957 **	4.473
	Cd 胁迫处理×水稻品种		57.548 ***	0.432	1.301	6.666 **	0.802	5.864

注:表中 TN、NH₄⁺-N、TOC、AP 分别表示总氮、铵态氮、总有机碳、有效磷;ND 表示未检测到。表中数据为平均值±标准误(n=4)。不同字母(a,b,c,d)表示同一生长期两种水稻不同 Cd 胁迫处理间的显著性差异,分析方法为单因素方差分析(P<0.05,n=4,Tukey' test)。采用双因素方差分析法(Tukey)对 Cd 浓度胁迫和水稻品种之间做比较分析,其中 F 表示膨胀系数,* ,P<0.05;** ,P<0.01;*** ,P<0.001。

2.4 水稻根系和叶片抗氧化酶活性

分蘖期 HH1 和 MH63 水稻根部 CAT 和 MDA 含量都是随着 Cd 胁迫浓度的增加呈先增加后下降趋势,同时 HH1 和 MH63 水稻根部 POD 含量随 Cd 浓度增加而增加(图 3)。HH1 和 MH63 水稻叶片中 CAT 含量随着 Cd 浓度增加而降低;随着 Cd 浓度胁迫的增加,叶片中 SOD 和 POD 的含量随之增加;叶片中 MDA 的含量呈先上升后降低的趋势。独立样本 T 检验结果表明,在分蘖期,相比于 HH1 水稻,Cd_{3.5}处理时,MH63 水稻的根系 POD、叶片的 CAT 含量更高;Cd₆₀处理时,MH63 的叶片 SOD、叶片 CAT 含量更高;Cd₂₄₀处理时,MH63 的叶片 POD 含量更高。在成熟期,相比于 HH1 水稻,Cd_{3.5}和 Cd₆₀处理时,MH63 水稻的叶片 POD 含量更高,Cd₂₄₀处理时,MH63 水稻的根系 POD 和叶片 POD 含量更高。Cd_{3.5}浓度胁迫下 MH63 水稻的根部 MDA 与 POD 含量均显著高于 HH1 水稻;Cd_{3.5}与 Cd₆₀处理的 MH63 水稻叶片中的 CAT 含量显著高于 HH1 水稻;Cd₆₀处理下 MH63 水稻的 SOD 含量显著高于 HH1 水稻;Cd₂₄₀胁迫处理下 MH63 水稻的叶片中 MDA、POD 含量显著高于 HH1 水稻(图 3)。

3 讨论

本研究发现,Cd 胁迫能明显降低水稻株高、生物量及产量。张锡洲等^[22]对 145 种水稻亲本材料进行了研究,发现 Cd 胁迫会对水稻生物量和株高产生不同程度的抑制。黄冬芬^[23]也发现 60 或 90 mg·kg⁻¹ 的土壤 Cd 胁迫对水稻产量无显著影响,而 120 或 180 mg·kg⁻¹ 的土壤 Cd 胁迫显著降低了水稻产量,主要原因在于高浓度的 Cd 胁迫了幼苗期水稻生长,该趋势与本研究一致。本研究进一步发现,在相同 Cd 胁迫下,HH1 水稻的株高、生物量及产量高于 MH63 水稻,说明外源 Bt 基因的转入能够提高水稻对 Cd 胁迫的抗性。类似研究表明,Cd 胁迫下,双抗氧化酶转基因水稻受抑制的程度明显低于其亲本^[24],转 pAPX 基因水稻生物量显著高于非转基因水稻^[25]。Wang 等^[26]研究发现,插入不同 Bt 基因的 MH63 水稻,其产量与亲本无显著差异或显著降低。这也与我们的结果一致。但我们的结果进一步证实在较高 Cd 胁迫(60 mg·kg⁻¹

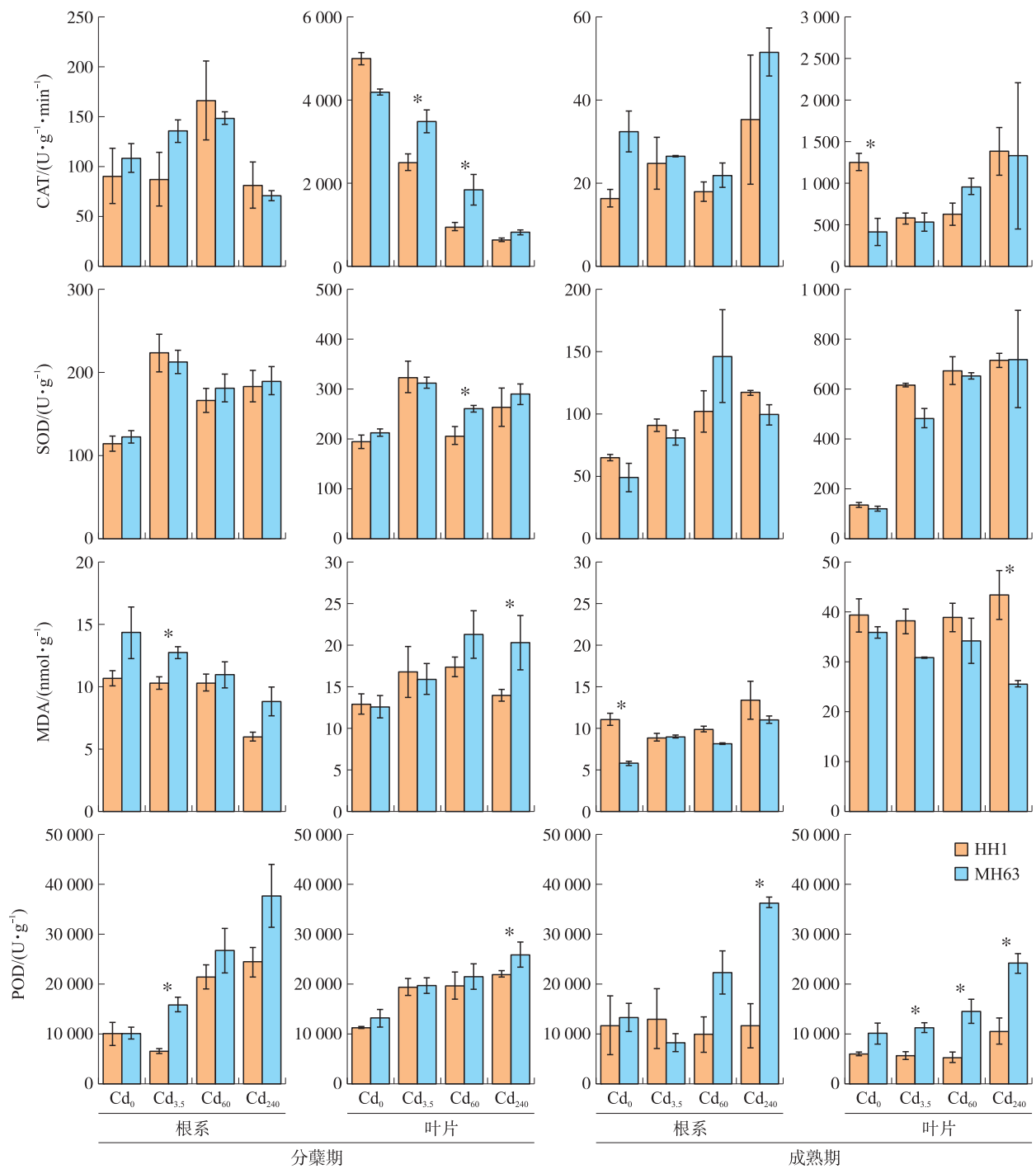


图 3 水稻根系和叶片中氧化酶活性 (* 代表 HH1 和 MH63 水稻间存在显著差异)

Fig. 3 Oxidase activity in roots and leaves of rice (* indicate the significant difference between HH1 and MH63)

和 240 mg·kg⁻¹) 下,转 Bt 基因水稻相比亲本具有更好的适应性。

本研究发现,HH1 和 MH63 水稻的根、茎、叶和籽粒中 Cd(II) 浓度无显著性差异,分布规律均为根>茎、叶>籽粒。朱超等^[27]的研究结果支持了本观点,认为 Cd 等重金属在水稻各器官的富集系数由根、茎、叶、糙米依次降低。本研究中,Cd₂₄₀ 处理的 HH1 水稻植株总 Cd(II) 含量显著高于 MH63,其主要原因是 HH1 水稻植株生物量较大所致。李玲等^[28]研究发现转 Bt 基因棉花(SGK3)的 Cd 富集能力略高于对照 TM-1。这也说明,转基因作物的品种对 Cd 的富集能力会产生影响。此外,根据国家标准(GB 2762—2022)规定,谷物镉残留的污染物限量应小于 0.2 mg·kg⁻¹^[29],因此 60 mg·kg⁻¹ 和 240 mg·kg⁻¹ 土壤 Cd 污染已经存在重金属超标风险。

MDA 产生量是一种鉴别逆境伤害的指标。本研究发现,分蘖期的 HH1 水稻具有比 MH63 水稻更好的

抗 Cd 能力,而成熟期则相反. 水稻内生解毒系统由 CAT、POD、SOD 等多种酶综合作用而成. 彭鸥等^[30-31]认为,在水稻生育过程中,POD、SOD 活性均呈现分蘖期高于乳熟期和齐(孕)穗期的趋势. 其研究结果还显示,分蘖期 HH1 水稻的 CAT、POD、SOD 酶活性均不如 MH63 水稻. 这说明,尽管 MH63 水稻解毒酶活性较高,但不足以抵消对应器官中高重金属 Cd 积累产生的负效应,反而会积累更多 DMA;最终表现为分蘖期 HH1 水稻具有比 MH63 水稻更好的抗 Cd 能力. 而成熟期 HH1 水稻抗 Cd 能力弱于 MH63 水稻,其主要原因是对于成熟期水稻,分泌 POD 是最主要的解毒方式,而在成熟期时 MH63 水稻中 POD 酶活性比 HH1 水稻更高的缘故. 随着水稻成熟,酶活力降低,种类减少,根际土壤解毒作用重要性增加. 而相比 MH63 水稻,种植 HH1 显著降低了土壤 pH 和 AP 值,酸性环境会加剧 Cd 胁迫对植物地上部分的抑制作用^[32],水稻器官中的 P 和 Cd 表现出一定的协同作用^[33],弱化了 HH1 水稻的整体抗性. 另外,根系微生物也可能存在调控作用^[34]. 总体而言,水稻对 Cd 的耐受原因多元复杂^[35],有待进一步研究.

4 结论

本研究结果显示,Cd 胁迫与外源基因转入都会对水稻农艺性状及各器官的 Cd 含量产生影响. Cd 胁迫能明显降低 HH1 与 MH63 水稻株高、生物量及产量. 相同 Cd 胁迫下,HH1 水稻的株高、生物量及产量高于 MH63 水稻,这说明外源 Bt 基因的转入能够改善水稻农艺性状. 从 MDA 累积量来看,分蘖期 HH1 水稻具有比 MH63 水稻更好的抗 Cd 能力,而成熟期则相反. 这种现象可能与植株各器官 Cd 含量、根系微环境和解毒酶系统三个因素有关.

[参考文献]

- [1] MC LAUGHLIN M J, PARKER D R, CLARKE J M. Metals and micronutrients-food safety issues[J]. *Field crops research*, 1999, 60(1/2): 143-163.
- [2] LIU J, LI K, XU J, et al. Lead toxicity, uptake, and translocation in different rice cultivars[J]. *Plant science*, 2003, 165(4): 793-802.
- [3] JACKSON A P, ALLOWAY B J. The transfer of cadmium from agricultural soils to the human food chain[J]. *Biogeochemistry of trace metals*, 2017: 121-170.
- [4] DICKINSON N M, LEPP N W. Metals and trees: impacts, responses to exposure and exploitation of resistance traits[C]// *Contaminated soils: 3rd International Conference on the Biogeochemistry of Trace Elements*. Paris, France, 1997, 85: 247-254.
- [5] DONG J, MAO W H, ZHANG G P, et al. Root excretion and plant tolerance to cadmium toxicity — a review[J]. *Plant soil and environment*, 2007, 53(5): 193-200.
- [6] 王宵宵, 钟文辉, 李磊, 等. 铜胁迫对抗虫转基因水稻根际土壤微生物的影响[J]. *土壤*, 2020, 52(1): 119-126.
- [7] 史静, 潘根兴, 夏运生, 等. 镉胁迫对两品种水稻生长及抗氧化酶系统的影响[J]. *生态环境学报*, 2013, 22(5): 832-837.
- [8] ALI Q, SHABAAN M, ASHRAF S, et al. Genetically modified rice stacked with antioxidants for nutrient enhancement and stress tolerance[M]// *Rice research for quality improvement: genomics and genetic engineering*. Singapore: Springer, 2020.
- [9] 贾茵, 刘才磊, 兰晓悦, 等. 镉胁迫对小报春幼苗生长及生理特性的影响[J]. *西北植物学报*, 2020, 40(3): 454-462.
- [10] MUNGAI N W, MOTAVALLI P P, NELSON K A, et al. Differences in yields, residue composition and N mineralization dynamics of Bt and non-Bt maize[J]. *Nutrient cycling in agroecosystems*, 2005, 73(1): 101-109.
- [11] WANG Y M, ZHANG G, DU J, et al. Influence of transgenic hybrid rice expressing a fused gene derived from cry1Ab and cry1Ac on primary insect pests and rice yield[J]. *Crop protection*, 2010, 29(2): 128-133.
- [12] XIA H, CHEN L Y, WANG F, et al. Yield benefit and underlying cost of insect-resistance transgenic rice: Implication in breeding and deploying transgenic crops[J]. *Field crops research*, 2010, 118(3): 215-220.
- [13] CHEN M, ZHAO J Z, GONG YIN Y E, et al. Impact of insect-resistant transgenic rice on target insect pests and non-target arthropods in China[J]. *Insect science*, 2006, 13(6): 409-420.
- [14] CLARK B W, PHILLIPS T A, COATS J R. Environmental fate and effects of *Bacillus thuringiensis* (Bt) proteins from transgenic crops: a review[J]. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2005, 53(12): 4643-4653.
- [15] 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.

- [16] 陈希. 茶园根际土壤与植物体养分对酸沉降的响应[D]. 江西:南昌大学,2015.
- [17] HAN C, LIU B, ZHONG W. Effects of transgenic Bt rice on the active rhizospheric methanogenic archaeal community as revealed by DNA-based stable isotope probing[J]. Journal of applied microbiology, 2018, 125(4): 1094–1107.
- [18] XU J, HAN C, JIANG Y B, et al. Spatial distribution and co-occurrence of aerobic ammonia oxidation and anaerobic ammonium oxidation activities in the water-soil interface, bulk, and rhizosphere regions of paddy soil[J]. Plant and soil, 2021, 466(1): 557–568.
- [19] 郭继斌, 王莉, 韩娇, 等. 联合浸提法测定土壤有效态镉[J]. 江苏农业科学, 2016, 44(3): 369–372.
- [20] 肖家欣. 植物生理学实验[M]. 安徽:安徽人民出版社, 2010.
- [21] WEI Z, HONG F, MING Y, et al. Subcellular and molecular localization of rare earth elements and structural characterization of yttrium bound chlorophyll a in naturally grown fern *Dicranopteris dichotoma*[J]. Microchemical journal, 2005, 80(1): 1–8.
- [22] 张锡洲, 张洪江, 李廷轩, 等. 水稻镉耐性差异及镉低积累种质资源的筛选[J]. 中国生态农业学报, 2013, 21(11): 1434–1440.
- [23] 黄冬芬. 水稻对土壤重金属镉的响应及其调控[D]. 扬州:扬州大学, 2008.
- [24] 宋新华, 镉和镉+高温对双抗氧化酶转基因水稻生长生理和抗氧化系统的影响[D]. 山东:山东师范大学, 2008.
- [25] 段苏然, 施卫明, 王俊儒. 过量表达 pAPX 基因提高水稻对镉胁迫的耐性[J]. 土壤学报, 2006, 1: 111–116.
- [26] WANG F, YE C, ZHU L Y, et al. Yield differences between Bt transgenic rice lines and their non-Bt counterparts, and its possible mechanism[J]. Field crops research, 2012, 126: 8–15.
- [27] 朱超, 文美兰, 刘攀峰, 等. 桂林灵川县典型有机水稻田重金属元素分布特征及污染评价[J]. 现代地质, 2021, 35(5): 1433–1440.
- [28] 李玲, 陈进红, 何秋伶, 等. 3个陆地棉种质(系)重金属镉的积累、转运和富集特性分析[J]. 棉花学报, 2012, 24(6): 535–540.
- [29] 中华人民共和国国家卫生健康委员会, 国家市场监督管理总局. 食品安全国家标准 食品中污染物限量: GB 2762–2022[S]. 北京:中国标准出版社, 2022.
- [30] 彭鸥, 叶长城, 刘玉玲, 等. Cd胁迫下水稻叶片 SOD 活性和 MDA 含量与糙米中 Cd 含量的相关性研究[J]. 生态毒理学报, 2019, 14(6): 233–240.
- [31] 章秀福, 王丹英, 储开富, 等. 镉胁迫下水稻 SOD 活性和 MDA 含量的变化及其基因型差异[J]. 中国水稻科学, 2006, 20(2): 194–198.
- [32] 任新宇, 罗晟, 魏宏宇, 等. 酸性环境对镉胁迫下水稻幼苗生长的影响[J]. 河南农业科学, 2022, 51(4): 39–47.
- [33] 霍洋, 仇银燕, 周航, 等. 外源磷对镉胁迫下水稻生长及镉累积转运的影响[J]. 环境科学, 2020, 41(10): 4719–4725.
- [34] 郑沈, 黄道友, 李波, 等. 外源 Fe 调控根系微生物群落结构和功能对水稻 Cd 积累的影响[J]. 环境科学, 2022, 43(8): 4313–4321.
- [35] 史静, 潘根兴, 夏运生, 等. 镉胁迫对两品种水稻生长及抗氧化酶系统的影响[J]. 生态环境学报, 2013, 22(5): 832–837.

[责任编辑:杜忆忱]