

# 圆褐固氮菌对转 Bt 棉花靶标害虫 棉铃虫的抗虫性影响\*

李 卓<sup>1\*\*</sup> 刘新东<sup>2</sup> 刘 飞<sup>2</sup> 颜 越<sup>3</sup> 张兴瑞<sup>1</sup>  
常春燕<sup>1</sup> 刘 洋<sup>1</sup> 戈 峰<sup>1\*\*\*</sup>

(1. 山东省农业科学院植物保护研究所, 济南 250100; 2. 济南护理职业学院, 济南 250109;  
3. 山东省农业生态与资源保护总站, 济南 250100)

**摘 要** 【目的】探究圆褐固氮菌 *Azotobacter chroococcum* 调控转 Bt 棉花的靶标抗虫效果。【方法】采用浸种包衣法, 对 Bt 棉 (Bt) 和非抗虫亲本 (Yu) 进行圆褐固氮菌处理 (AC) 和固氮菌培养液对照处理 (CK), 测定不同处理棉花叶片的 Bt 蛋白表达量和氮代谢生理, 以及取食不同处理棉花叶片后靶标害虫棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 的生长发育、繁殖和营养利用等变化。【结果】相较于固氮菌培养液对照处理, 圆褐固氮菌处理的棉花叶片中 Bt 蛋白表达 (Bt: +26.73%)、可溶性蛋白含量 (Bt: +17.69%; Yu: +6.16%) 和谷氨酸丙酮酸转氨酶活性 (Bt: +72.64%; Yu: +60.27%) 均显著增加 ( $P < 0.01$ ), 游离氨基酸含量 (Bt: - 0.90%; Yu: - 5.80%) 和蛋白酶活性显著降低 (Bt: - 1.83%; Yu: - 4.06%) ( $P \leq 0.001$ )。相较于固氮菌培养液对照处理, 圆褐固氮菌处理的 Bt 棉叶棉铃虫的幼虫历期 (+11.57%)、蛹期 (+1.03%)、相对消耗率 (+6.07%) 和近似消化率 (+4.17%) 呈现显著增加 ( $P < 0.05$ ), 其成虫寿命 (- 4.09%)、化蛹率 (- 46.09%)、蛹重 (- 21.09%)、单雌产卵量 (-59.86%)、内禀增长率 (- 9.31%)、相对生长率 (- 4.26%)、净转化率 (- 5.82%) 和毛转化率 (- 5.51%) 有显著下降 ( $P < 0.05$ ), 而取食圆褐固氮菌处理非抗虫亲本棉叶的棉铃虫生长发育、繁殖及取食营养利用则呈现相反规律性。【结论】接种圆褐固氮菌可提高棉花的氮素利用效率和 Bt 棉毒蛋白的表达, 进而提升其对靶标害虫棉铃虫的抗虫能力。

**关键词** 圆褐固氮菌; 转 Bt 棉花; 棉铃虫; Bt 蛋白; 氮代谢生理; 生长发育; 繁殖力

## Effects of *Azotobacter chroococcum* inoculation on the target insect-resistance of transgenic Bt cotton

LI Zhuo<sup>1\*\*</sup> LIU Xin-Dong<sup>2</sup> LIU Fei<sup>2</sup> YAN Yue<sup>3</sup> ZHANG Xing-Rui<sup>1</sup>  
CHANG Chun-Yan<sup>1</sup> LIU Yang<sup>1</sup> GE Feng<sup>1\*\*\*</sup>

(1. Institute of Plant Protection, Shandong Academy of Agricultural Sciences, Jinan 250100, China; 2. Jinan Vocational College of Nursing, Jinan 250109, China; 3. Shandong Rural Energy and Environment Agency, Jinan 250100, China)

**Abstract** 【Aim】To clarify the effects of *Azotobacter chroococcum* inoculation on the target insect-resistance of transgenic Bt cotton. 【Methods】We used the seed immersion coating method to infect Bt cotton (Bt) and non-Bt cotton (Yu) seeds with *Azotobacter chroococcum* (AC) and the sterilized medium (CK). A laboratory test was carried out to study the Bt toxin protein expression and nitrogen metabolism physiology of cottons inoculated with *A. chroococcum*, and investigate the growth, development, reproduction and food utilization of cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* fed on cottons infected by *A. chroococcum*. 【Results】The findings indicated that the infection of azotobacter significantly increased the Bt toxin protein

\*资助项目 Supported projects: 国家自然科学基金青年科学基金项目 (32202405); 国家重点研发计划项目 (2023YFD1400800); 山东省顶尖人才“一事一议”项目 (2023YSYY-006); 农业虫害鼠害综合治理研究国家重点实验室开放研究基金资助项目 (IPM2001); 山东省农业科学院农业科技创新工程 (CXGC2023F04)

\*\*第一作者 First author, E-mail: lizhuo0613@163.com

\*\*\*通讯作者 Corresponding author, E-mail: gef@ioz.ac.cn

收稿日期 Received: 2023-05-01; 接受日期 Accepted: 2024-07-29

expression (+26.73%) and the nitrogen metabolism indexes of cotton, as soluble protein content (Bt: +17.69%; Yu: +6.16%), GPT (Bt: +72.64%; Yu: +60.27%) ( $P < 0.01$ ), except for the decreasing Free amino acids content (Bt: - 0.90%; Yu: - 5.80%) and protease activity (Bt: - 1.83%; Yu: - 4.06%) ( $P \leq 0.001$ ). Compared to CK, AC treatment obviously increased the larval life-span (+11.57%), pupal duration (+1.03%), relative consumption rate (+6.07%) and approximate digestibility (+4.17%) of *H. armigera* ( $P < 0.05$ ), and reduced the adult longevity (- 4.09%), pupation rate (- 46.09%), pupal weight (- 21.09%), fecundity (- 59.86%), innate rate of increase (- 9.31%), relative growth rate (- 4.26%), efficiency of conversion of digested food (- 5.82%) and efficiency of conversion of ingested food (- 5.51%) of *H. armigera* ( $P < 0.05$ ). There were opposite trends on the growth, development, reproduction and food utilization of *H. armigera* fed on non-Bt cotton infected by *A. chroococcum* compared with CK. **[Conclusion]** Overall results significantly depicted that the infection of azotobacter had positive effects on the Bt toxin protein expression and nitrogen utilization of Bt cotton to enhance the target insect-resistance.

**Key words** *Azotobacter chroococcum*; transgenic Bt cotton; *Helicoverpa armigera*; Bt toxin protein; nitrogen metabolism physiology; growth and development; reproduction

转 Bt (*Bacillus thuringiensis*) 基因抗虫棉花 (简称“Bt 棉”) 的大面积应用可有效防治如棉铃虫 *Helicoverpa armigera*、斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* 和甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* 等鳞翅目靶标害虫 (Basavaraja *et al.*, 2008; 苏宏华等, 2010; Li *et al.*, 2014; 李卓等, 2024), 其推广规模在世界范围内迅速增长, 目前已占全球棉花种植总面积的 60% 以上 (陆宴辉, 2012)。我国自 1997 年开始种植 Bt 棉, 部分地区推广种植杂交抗虫棉, 长期的单一化种植和 Bt 蛋白含量稀释, 加速了棉铃虫等靶标害虫的抗性产生 (唐中杰等, 2023)。

氮素是转 Bt 作物外源毒素的主要构成物质, 研究表明通过土壤氮肥的优化管理可提高转 Bt 作物的氮素代谢水平, 对其外源毒素的表达代谢有显著提高 (Stitt and Krapp, 1999; Li *et al.*, 2019, 2023)。常规氮素营养多以土壤施氮肥为主, 棉花属于氮敏感植物, 田间过多施用氮肥可导致植株疯长、柔弱、坐桃少且减产下降 (石荣媛等, 2015)。利用生物固氮手段来优化氮肥管理, 具有减少化肥施用、增加作物氮素利用效率、提升作物产量和营养品质等优势。土壤中起固氮效果并促进作物生长的细菌主要为固氮菌属 (Elshanshoury, 1995; Raju *et al.*, 2008; Romeroperdomo *et al.*, 2017)。本研究在前期筛选出的一株棉花高效固氮菌种 (圆褐固氮菌 *Azotobacter chroococcum*) 基础上, 通过研究不同固氮菌处理的棉花叶片中 Bt 蛋白表达量和氮代谢生理, 以及取食不同处理棉花叶片后靶标害

虫棉铃虫的生长发育、繁殖和营养利用等, 阐释了固氮菌作为生物调控手段提高 Bt 棉花靶标抗虫效果的可能性, 以期为我国转 Bt 棉田的安全可持续生产, 尤其是延缓靶标抗性和害虫绿色防控等方面提供理论基础和数据支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

供试固氮菌: 圆褐固氮菌 (ACCC 10006) 购置于中国农业微生物菌种保藏管理中心。其固氮菌培养液配方为蔗糖或甘露醇 10.0 g、 $\text{CaCO}_3$  1.0 g、 $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  0.5 g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.2 g 和 NaCl 0.2 g 溶解于 1 000 mL 无菌水, pH 7.0-7.2。

供试棉花: 转 Bt 棉花为鲁棉研 37 号 (表达 *Cry1Ab/Cry1Ac* 毒素, 鲁农审 2009024 号, 简称“Bt”) 和非抗虫亲本为豫 2067 (国审棉 20000003 号, 简称“Yu”) 均由山东省农业科学院经作所农业部黄淮海棉花遗传改良与栽培生理重点实验室提供, 适于北方田地耕种且生育期一致。供试棉花单株种植在塑料花盆 (高: 直径 = 12 cm : 18 cm) 中, 壤质土: 营养土 = 1 : 1 配比, 并进行 121 °C 高温灭菌, 置于光照培养箱 [温度 (26±1) °C、相对湿度 65%±5%、光周期 14L : 10D] 内培养至现蕾期供试。

供试虫源: 以棉铃虫为靶标害虫, 虫源为 2005 年河北省廊坊棉田采集, 在中国农业科学院植物保护研究所连续饲养 40 代以上的敏感品系, 在光照培养箱 [温度 (26±1) °C、相对湿度

65%±5%、光周期 14L : 10D]内以人工饲料喂养 (秦启联, 2015)。

药剂、试剂和仪器: 酶联免疫 (ELISA) 试剂盒 (96 孔板, 海门博阳实验器材厂), 光照培养箱 (GDN-400D-4, 宁波江南仪器厂), 酶联免疫检测仪 (美国 BIO-RAD 公司), 恒温摇床 (Excella E24, 德国 Eppendorf 公司), 分光光度计 (美国 Thermo 公司), M5 多功能酶标仪 (美谷分子仪器 (上海) 有限公司)。

## 1.2 试验方法

**1.2.1 试验设置** 共设置 4 组处理, 即 2 组固氮菌处理 (圆褐固氮菌, *A. chroococcum*, 简称 “AC”) 和固氮菌培养液对照, 简称 “CK”) × 2 组棉花品种处理 (Bt 棉, 简称 “Bt” 和非抗虫亲本, 简称 “Yu”)。供试棉铃虫 3 龄幼虫用养虫盒 (直径: 高度 = 5 cm : 3 cm) 单头饲养, 30 头为 1 次重复, 重复 5 次, 4 组处理所需棉铃虫共 600 头。每天早上 9: 00 更换不同处理棉叶, 并用万分位天平称量新叶重、取食后旧叶重、棉铃虫重和排出粪便的鲜重, 每天收集取食后旧叶和排出粪便, 利用烘箱 (80 °C, 72 h) 烘干至恒重, 称量干重。

**1.2.2 固氮菌接种处理** 将圆褐固氮菌冻干管开启, 加入到固氮菌培养液培养基并置于恒温摇床 (28 °C, 200 r/min) 内进行活化富集, 待菌液吸光度超过 1.000 (600 nm 波长) 时利用构建的特异性引物 (*A. chroococcum* NifH gene, Forward: 5'-GTGACCCGAAAGCTGACTCC-3'; Reverse: 5'-CCACCTTCAGCACGTCTTCC-3') 进行荧光定量 PCR 实时监测其浓度, 利用灭菌的固氮菌培养液将菌液浓度稀释至  $1 \times 10^8$  /mL, 留用于后续的浸种包衣。利用灭菌手术刀在已表面消毒的棉种上轻微划开表皮, 倒入同体积的 AC 菌液和固氮菌培养液, 液体刚好浸没种子, 在 28 °C 恒温培养箱中放置 1-2 d, 待种子发芽。随后, 将发芽的种子植入装有灭菌土的塑料花盆内, 置于光照培养箱 (条件同 1.1 节) 培养待测, 利用荧光定量 PCR (98 °C, 2 min; 35 个循环变性, 98 °C, 10 s; 退火 72 °C, 10 s; 延伸 72 °C, 5 min) 分别监测棉花播种前 1 d 和现蕾期的土壤圆褐固氮菌含量。

表 1 固氮菌处理的转 Bt 棉花与非抗虫亲本棉花播种前 1 d 和现蕾期根际土圆褐固氮菌含量  
Table 1 Azotobacter densities in the sampled rhizosphere soil of Bt cotton (Bt) and non-Bt cotton (Yu) infected with *Azotobacter chroococcum* (AC) and the sterilized medium (CK) at 1 d before planting and at squaring stage

| 取样时间<br>Sampled time           | 棉花品种<br>Cotton cultivars | 固氮菌处理<br>Azotobacter treatments | 圆褐固氮菌含量<br>(复制数/g)<br>AC (copies/g) |
|--------------------------------|--------------------------|---------------------------------|-------------------------------------|
| 播种前 1 d<br>1 d before planting | /                        | /                               | $(4.67 \pm 0.33) \times 10^5$ b     |
| 现蕾期<br>Squaring stage          | Bt                       | AC                              | $(9.16 \pm 0.14) \times 10^{11}$ a  |
|                                |                          | CK                              | $(4.70 \pm 0.29) \times 10^5$ b     |
|                                | Yu                       | AC                              | $(9.11 \pm 0.17) \times 10^{11}$ a  |
|                                |                          | CK                              | $(4.71 \pm 0.28) \times 10^5$ b     |

棉花品种: 转 Bt 棉花 (Bt) vs. 非抗虫亲本 (Yu); 固氮菌处理: 圆褐固氮菌 (AC) vs. 固氮菌培养液 (CK); /: 无; 表中数据为平均数±标准误; 不同小写字母表示 4 组处理之间 (棉花品种 × 固氮菌处理) 经 Duncan 检验在  $P < 0.05$  水平上差异显著。

Cotton cultivars: Bt cotton (Bt) vs. non-Bt cotton (Yu); Azotobacter treatments: *A. chroococcum* (AC) vs. the sterilized medium (CK); /: None; Data in the table are mean±SE, and followed by the different lowercase letters indicate significantly difference among 4 treatments (cotton cultivars × azotobacter treatments) by Duncan's test at  $P < 0.05$ .

**1.2.3 Bt 蛋白表达量检测** 称取 1 g 不同处理现蕾期的棉花一级分枝上、长势一致的新鲜叶片, 加入 1 mL 提取液 (0.1 mol/L 碳酸盐缓冲液, pH 9.5) 在低温液氮环境下充分研磨, 离心取上清液备用。用酶联免疫法 (ELISA) 对鲜样的 Bt 蛋白含量进行定量检测, 方法见参考文献 (Gnagadasu *et al.*, 2018)。

**1.2.4 氮代谢相关物质和酶活性测定** 称取 1 g 不同处理现蕾期的棉花一级分枝上、长势一致的新鲜叶片, 加入 1 mL 提取液 (0.05 mol/L Tris-HCl 缓冲液, pH 7.2) 在低温液氮环境下充分研磨, 离心取上清液备用。采用赖氏比色法 (张祥等, 2010) 对样品的谷氨酸丙酮酸转氨酶 (GPT) 和谷氨酸草酰乙酸转氨酶 (GOT) 活性进行测定; 棉叶蛋白酶活性和可溶性蛋白含量分别采用蛋白酶活性测定试剂盒和植物可溶性蛋白含

量测定试剂盒进行检测(苏州科铭生物技术有限公司)。

**1.2.5 棉铃虫生长发育和繁殖指标测定** 将初孵棉铃虫幼虫接入不同处理的棉叶上,每天观察记录幼虫龄期和虫重,幼虫体重取预蛹前的最大体重值,蛹重以化蛹后第 2 天蛹重为准。每天早上 9:00 定时更换叶片并称量记录,统计棉铃虫幼虫蜕皮、化蛹、羽化日期和成虫雌雄性别等信息。

棉铃虫羽化后,雌雄 1:1 配对放入交配盒(直径:高=10 cm:15 cm)内,用脱脂棉纱封口,期间喂食 10%蔗糖水。每天调查成虫产卵量,定时更换封口棉纱和蔗糖水,并计算种群的内禀增长率(Innate rate of increase,  $r_m$ ),计算公式见表 2。

**1.2.6 棉铃虫营养利用指标测定** 设有 5 个营养利用指标,即相对生长率(Relative growth rate, RGR)、相对消耗率(Relative consumption rate, RCR)、净转化率(Efficiency of conversion of digested food, ECD)、毛转化率(Efficiency of conversion of ingested food, ECI)和近似消化率(Approximate digestibility, AD),计算公式见表 2。

| 表 2 各指标计算公式<br>Table 2 The calculation of indexes     |                                                                |
|-------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|
| 测定指标<br>Measure indexes                               | 计算公式<br>Calculation of indexes                                 |
| 内禀增长率 $r_m$<br>Innate rate of increase                | $r_m = \ln(\text{净生殖率}) / \text{发育历期}$                         |
| 相对生长率 RGR<br>Relative growth rate                     | $RGR = \text{幼虫增加质量} / (\text{发育历期} \times \text{幼虫平均体质量})$    |
| 相对消耗率 RCR<br>Relative consumption rate                | $RCR = \text{取食食物质量} / (\text{发育历期} \times \text{幼虫平均体质量})$    |
| 净转化率 ECD<br>Efficiency of conversion of digested food | $ECD = \text{幼虫增加质量} / (\text{取食量} - \text{粪便量}) \times 100\%$ |
| 毛转化率 ECI<br>Efficiency of conversion of ingested food | $ECI = \text{幼虫增加质量} / \text{取食量} \times 100\%$                |
| 近似消化率 AD<br>Approximate digestibility                 | $AD = (\text{取食量} - \text{粪便量}) / \text{取食食物质量} \times 100\%$  |

1.3 数据分析

所有数据均使用 SPSS 25.0 (SPSS Institute, Chicago) 软件进行统计分析,采用 Duncan 氏新复极差法进行处理间的差异显著性检验。数据分析前,使用 Levene's test ( $P > 0.10$ ) 和 Shapiro-Wilk test 分别检验数据的方差齐性和正态分布性,以上检测结果如果不符合正态分布,则根据数据的特点对数据进行正态化变换,以符合方差分析要求。

2 结果与分析

2.1 棉花接种固氮菌对根际土壤中圆褐固氮菌含量的影响

在棉花现蕾期发现,相较于固氮菌培养液对照处理(CK) [Bt 棉,  $Bt: (4.70 \pm 0.29) \times 10^5$ ; 非抗虫亲本,  $Yu: (4.71 \pm 0.28) \times 10^5$ ], 通过浸种包衣法接种固氮菌的棉花根际土中圆褐固氮菌含量 [ $Bt: (9.16 \pm 0.14) \times 10^{11}$ ;  $Yu: (9.11 \pm 0.17) \times 10^{11}$ ] 显著增加 ( $P < 0.001$ ) (表 1)。播种前 1 d 的根际土样 [ $(4.67 \pm 0.33) \times 10^5$ ] 与现蕾期固氮菌培养液对照处理的棉花根际土样之间无显著差异 ( $P > 0.05$ ), 与现蕾期圆褐固氮菌处理组 (AC) 的根际土样相比存在显著差异 ( $P < 0.001$ ), 表明浸种包衣法成功接种了圆褐固氮菌并改变了现蕾期根际土壤中固氮菌含量。

2.2 接种固氮菌对现蕾期 Bt 棉和非抗虫亲本棉叶中 Bt 蛋白、氮代谢相关物质含量和酶活的影响

由表 3 可知,与固氮菌培养液对照处理 ( $Bt: 484.00 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ ) 相比,圆褐固氮菌处理 ( $Bt: 613.35 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ ) 的 Bt 棉叶 Bt 蛋白表达量显著增加,增幅为 26.73% ( $P < 0.001$ ); 相较固氮菌培养液对照处理 ( $Bt: 17.06 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ;  $Yu: 12.27 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ), 圆褐固氮菌处理 ( $Bt: 20.07 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ;  $Yu: 13.02 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ) 的棉叶可溶性蛋白含量分别显著增加了 17.69% 和 6.16% ( $P < 0.01$ ); 而相较固氮菌培养液对照处理 ( $Bt: 340.38 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ ;  $Yu: 323.11 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ ), 圆褐固氮菌处理 ( $Bt:$

337.34  $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ ; Yu: 305.39  $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ ) 的棉叶游离氨基酸显著减少了 - 0.90%和 - 5.80% ( $P \leq 0.001$ )。此外, 相较固氮菌培养液对照处理, 圆褐固氮菌处理后棉花叶片内与蛋白质合成有关的谷氨酸丙酮酸转氨酶活性有显著增长 (Bt: +72.64%; Yu: +60.27%) ( $P < 0.001$ ), 而与蛋白质分解有关的酶活性呈显著下降 (Bt: - 1.83%; Yu: - 4.06%) 趋势 ( $P < 0.001$ )。Duncan 检验表明, 固氮菌处理间不同棉花叶片中 Bt 蛋白和可溶性蛋白含量, 以及谷氨酸丙酮酸转氨酶和蛋白酶活性均有极显著差异 ( $P < 0.001$ ) (表 3)。

表 3 接种固氮菌处理的现蕾期转 Bt 棉花和非抗虫亲本 Bt 蛋白表达量、氮代谢相关物质和酶活性  
Table 3 Bt protein expression, nitrogen metabolism-related substances and enzyme activities of transgenic Bt cotton and non-Bt cotton infected with *Azotobacter chroococcum* (AC) and the buffer solution (CK) at squaring stage

| 测定指标<br>Measured indexes                                                                                                                    | 转 Bt 棉花 (Bt)   |                | 非抗虫亲本 (Yu)     |                |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
|                                                                                                                                             | AC             | CK             | AC             | CK             |
| Bt 蛋白含量 ( $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ )<br>Bt protein content ( $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ )                                           | 613.35±6.78 a  | 484.00±3.19 b  | /              | /              |
| 可溶性蛋白含量 ( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ )<br>Soluble protein content ( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ )                                      | 20.07±0.90 Aa  | 17.06±0.37 Ab  | 13.02±0.91 Ba  | 12.27±0.45 Bb  |
| 游离氨基酸含量 ( $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ )<br>Free amino acids content ( $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ )                             | 337.34±1.96 Ab | 340.38±5.58 Aa | 305.39±2.05 Bb | 323.11±2.98 Ba |
| 谷氨酸丙酮酸转氨酶活性 ( $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ )<br>GPT activity ( $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ) | 24.35±0.54 Aa  | 14.10±0.32 Ab  | 20.75±0.67 Ba  | 12.95±0.06 Bb  |
| 蛋白酶活性 ( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ )<br>Protease activity ( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ )                                              | 1.80±0.01 Ab   | 1.83±0.01 Aa   | 1.71±0.01 Bb   | 1.78±0.01 Ba   |

固氮菌处理: 圆褐固氮菌 (AC) vs. 固氮菌培养液 (CK)。表中数据为平均数±标准误, 同一测定指标中不同大写、小写字母分别表示棉花品种和固氮菌处理经 Duncan 检验在  $P < 0.05$  水平差异显著。  
Azotobacter treatments: *A. chroococcum* (AC) vs. the buffer solution (CK). Data in the table are mean±SE, and followed by the different uppcase and lowercase letters indicate significantly difference between cotton cultivars (Bt and Yu) and between azotobacter treatments (AC and CK) in same measure index at squaring stage by Duncan's test at  $P < 0.05$ , respectively.

2.3 取食接种固氮菌的 Bt 棉和非抗虫亲本棉叶的棉铃虫生长发育和繁殖力变化

棉铃虫幼虫取食接种固氮菌的 Bt 棉花叶片, 其发育历期 (圆褐固氮菌处理, AC: 19.54 d; 固氮菌培养液对照处理, CK: 17.51 d) 和蛹期 (AC: 11.16 d; CK: 11.05 d) 有延缓趋势, 成虫寿命 (AC: 8.55 d; CK: 8.90 d)、化蛹率 (AC: 20.28%; CK: 29.63%)、蛹重 (AC: 0.14 g; CK: 0.17 g) 和单雌产卵量 (AC: 147.00 粒; CK: 235.00 粒) 均有下降趋势; 而取食接种固氮菌的非抗虫亲本棉叶, 发育历期 (AC: 16.03 d; CK: 16.95 d) 和蛹期 (AC: 9.92 d; CK: 10.63 d) 有缩短趋势, 成虫寿命 (AC: 10.82 d; CK:

9.22 d)、化蛹率 (AC: 86.65%; CK: 70.51%)、蛹重 (AC: 0.24 g; CK: 0.19 g) 和单雌产卵量 (AC: 484.00 粒; CK: 310.67 粒) 有上升趋势, 呈相反规律性 (图 1: A-F)。与固氮菌培养液对照处理相比, 取食圆褐固氮菌处理的 Bt 棉叶棉铃虫幼虫历期 (+11.57%) 和蛹期 (+1.03%) 呈现显著增加 ( $P < 0.05$ ), 其成虫寿命 (- 4.09%)、化蛹率 (- 46.09%)、蛹重 (- 21.09%) 和单雌产卵量 (- 59.86%) 有显著下降 ( $P < 0.05$ ) (图 1), 而取食圆褐固氮菌处理非抗虫亲本棉叶棉铃虫的生长发育和繁殖力呈现相反规律性 (图 1: A-F)。Duncan 检验表明, 固氮菌处理与棉花品种处理对棉铃虫的生长发育和繁殖力具有显著性影响 ( $P < 0.05$ ) (图 1: A-F)。

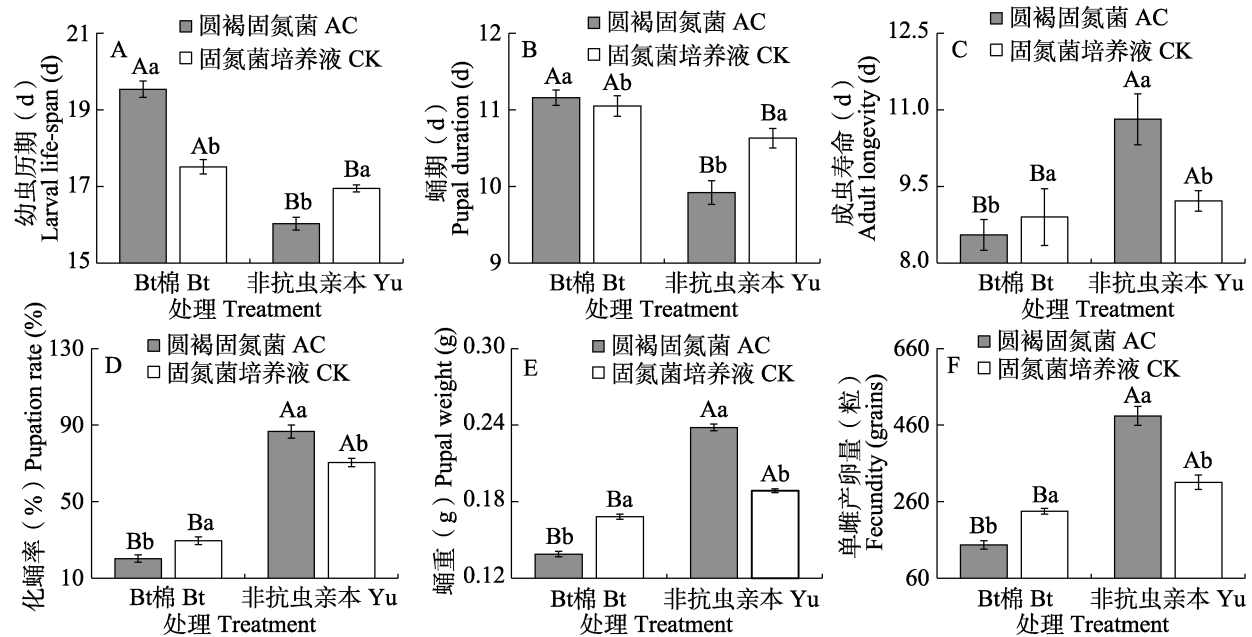


图 1 取食接种圆褐固氮菌 (AC) 和固氮菌培养液 (CK) 的现蕾期 Bt 棉 (Bt) 和非抗虫亲本 (Yu) 棉花叶片的棉铃虫幼虫历期 (A)、蛹期 (B)、成虫寿命 (C)、化蛹率 (D)、蛹重 (E) 和单雌产卵量 (F)

Fig. 1 The larval life-span (A), pupal duration (B), adult longevity (C), pupation rate (D), pupal weight (E) and fecundity (F) of cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* fed on the detached leaves of Bt cotton (Bt) and non-Bt cotton (Yu) infected with *Azotobacter chroococcum* (AC) and the buffer solution (CK) at squaring stage

图中数据为平均数±标准误, 柱上标有不同大写、小写字母分别表示棉花品种和固氮菌处理经 Duncan 氏检验在  $P < 0.05$  水平差异显著。下图同。

Data in the figure represent the mean±SE. Different uppercase and lowercase letters above bars indicate significantly difference between cotton cultivars (Bt and Yu) and between azotobacter treatments (AC and CK) by Duncan's test at  $P < 0.05$ , respectively. The same below.

## 2.4 取食接种固氮菌的 Bt 棉和非抗虫亲本棉叶的棉铃虫内禀增长率和取食营养利用变化

棉铃虫幼虫取食接种固氮菌的 Bt 棉花叶片, 其内禀增长率 (AC: 0.22; CK: 0.24)、相对增长率 (AC:  $101.18 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ; CK:  $105.49 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ )、净转化率 (AC: 23.97%; CK: 25.37%) 和毛转化率 (AC: 19.20%; CK: 20.26%) 有下降趋势, 相对消耗率 (AC:  $556.84 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ; CK:  $524.99 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ) 和近似消化率 (AC: 77.92%; CK: 74.80%) 呈上升趋势; 棉铃虫幼虫取食接种固氮菌的非抗虫亲本棉花叶片, 其内禀增长率 (AC: 0.30; CK: 0.26)、相对增长率 (AC:  $118.74 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ; CK:  $111.10 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ )、净转化率 (AC: 30.85%; CK: 28.60%) 和毛转化率 (AC: 22.67%; CK:

21.36%) 有升高趋势, 相对消耗率 (AC:  $401.28 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ; CK:  $459.75 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ) 和近似消化率 (AC: 70.38%; CK: 71.39%) 呈现下降趋势。与固氮菌培养液对照处理相比, 取食圆褐固氮菌处理的 Bt 棉叶棉铃虫相对消耗率 (+6.07%) 和近似消化率 (+4.17%) 呈现显著增加 ( $P < 0.05$ ), 其内禀增长率 (-9.31%)、相对增长率 (-4.26%)、净转化率 (-5.82%) 和毛转化率 (-5.51%) 有显著下降 ( $P < 0.05$ ) (图 2: A-F), 而取食圆褐固氮菌处理非抗虫亲本棉叶棉铃虫的内禀增长率和取食营养利用呈现相反规律性 (图 2: A-F)。Duncan 检验显示, 固氮菌处理与棉花品种处理对棉铃虫的内禀增长率和取食营养利用具有显著性影响 ( $P < 0.05$ ) (图 2: A-F)。

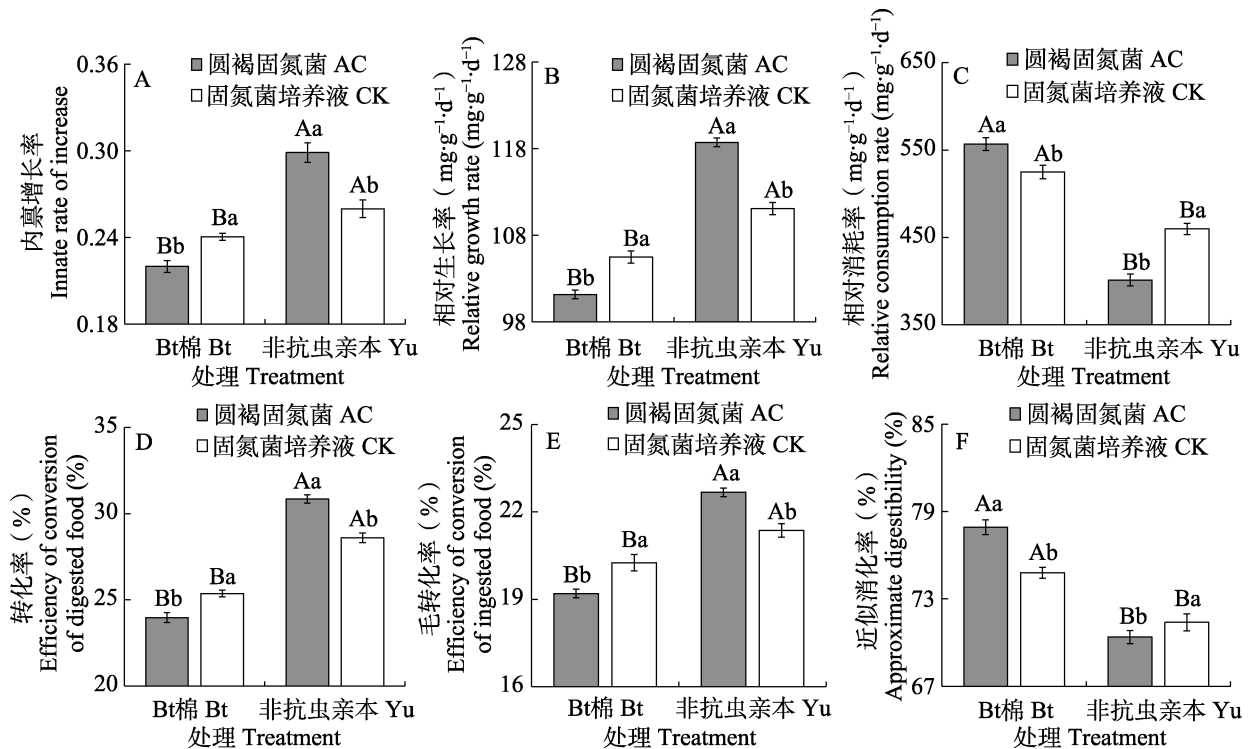


图2 取食接种圆褐固氮菌 (AC) 和固氮菌培养液 (CK) 的现蕾期 Bt 棉 (Bt) 和非抗虫亲本 (Yu) 棉花叶片的棉铃虫内禀

增长率 (A)、相对生长率 (B)、相对消化率 (C)、净转化率 (D)、毛转化率 (E) 和近似消化率 (F)

Fig. 2 The innate rate of increase (A), relative growth rate (B), relative consumption rate (C), efficiency of conversion of digested food (D), efficiency of conversion of ingested food (E) and approximate digestibility (F) of cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* fed on the detached leaves of Bt cotton (Bt) and non-Bt cotton (Yu) infected with *Azotobacter chroococcum* (AC) and the buffer solution (CK) at squaring stage

### 3 讨论与结论

棉花是世界性的重要经济作物, 长期以来虫害一直制约着棉花生产安全。随着基因工程技术的飞速发展, 转 Bt 基因抗虫棉花品种陆续培育成功, 其大面积推广应用被认为可从根本上减轻鳞翅目等靶标害虫的暴发危害 (韩兰芝等, 2007)。然而, 自 20 世纪 90 年代我国引入转 Bt 棉花以来, 部分地区推广种植杂交抗虫棉, 其 Bt 毒素含量被稀释, 再加之长期单一化种植, 加速了棉铃虫等靶标害虫抗药性的产生。研究结果显示, 本实验室饲养的敏感品系棉铃虫取食 Bt 棉花叶片后仍有较高的化蛹率和产卵量, 存在明显的 Bt 抗性演化风险。如何绿色高效的提升现有 Bt 棉组织中 Bt 蛋白表达量及其靶标抗虫效果, 进而延缓靶标害虫的抗药性产生,

是我国转 Bt 棉花长期安全生产和可持续利用的重要问题。

Bt 棉的抗虫能力在很大程度上取决于 Bt 蛋白的含量 (Bakhsh *et al.*, 2011), 而 Bt 蛋白作为一种可溶性蛋白, 其合成与氮素营养水平密切相关, 易受作物氮代谢生理的影响 (代建龙等, 2012)。研究表明, 通过土壤氮肥的优化管理可提高转 Bt 作物的氮素代谢水平 (Stitt and Krapp, 1999), 并对其 Bt 蛋白的表达代谢有显著提高作用 (Li *et al.*, 2019)。传统的氮素营养管理多以土壤施加氮肥等化肥为主。相较于增施化肥, 本研究通过浸种包衣法, 将圆褐固氮菌接种到 Bt 棉和非抗虫亲本棉籽中, 利用生物固氮优化氮肥管理。结果显示, 这种方法成功接种了圆褐固氮菌, 并可有效改变棉花现蕾期根际固氮菌含量, 具有生物固氮的巨大潜力。同时, 固氮菌处理显著提升了 Bt 棉和非抗虫亲本的氮素代谢生理,

可通过提高作物自身氮素利用效率来简化田间氮肥管理,增加了棉花自身营养水平,提高了非抗虫亲本棉花的棉铃虫适口性,不利于棉田害虫管理;但对于 Bt 棉,固氮菌可直接提升其 Bt 蛋白表达量,进而影响靶标害虫(棉铃虫)的生长发育和繁殖,对 Bt 棉田的靶标害虫绿色防控具有极大的推广应用价值。

综上所述,圆褐固氮菌具有提升 Bt 棉靶标抗虫能力的巨大潜力和推广应用价值,符合当下我国推行的环境友好、生态可持续的农业发展方针政策,有利于 Bt 棉的推广应用,最终服务于转 Bt 作物的安全生产和生态可持续利用。

## 参考文献 (References)

- Bakhsh A, Shahzad K, Husnain T, 2011. Variation in the spatio-temporal expression of insecticidal genes in cotton. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*, 47(1): 1–9.
- Basavaraja H, Chhillar BS, Singh R, 2008. Effect of transgenic Bt cotton top leaves on consumption-utilization indices of *Helicoverpa armigera* (Hübner) and *Spodoptera litura* (Fabricius) larvae. *Journal of Cotton Research & Development*, 22: 101–106.
- Dai JL, Dong HZ, Duan LS, Li ZH, Lu HQ, 2012. Effects of nitrogen fertilization on Bt cotton growth and Bt protein concentration in leaves under salinity stress. *Cotton Science*, 24(4): 303–311. [代建龙, 董合忠, 段留生, 李振怀, 卢合全, 2012. 施氮肥对盐胁迫下 Bt 棉生长和叶片 Bt 蛋白含量的影响. 棉花学报, 24(4): 303–311.]
- Elshanshoury AR, 1995. Interactions of *Azotobacter chroococcum*, *Azospirillum brasilense* and *Streptomyces mutabilis*, in relation to their effect on wheat development. *Journal of Agronomy & Crop Science*, 175(2): 119–127.
- Gnagadasu S, Bhanushali JK, Mangamuri UK, Rao KR, Poda S, 2018. Development of monoclonal antibodies against Cry1Ac/Ab protein for designing of sandwich ELISA to detect BT toxin from cotton seeds and leaves. *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy*, 12(3): 218–229.
- Han LZ, Bai SX, Zhao JZ, Wang ZY, Wu KM, 2007. Progress in ecological biosafety of insect-resistant transgenic cotton and corn in relation to arthropods. *Acta Entomologica Sinica*, 50(7): 727–736. [韩兰芝, 白树雄, 赵建周, 王振营, 吴孔明, 2007. 转基因抗虫棉花和玉米与节肢动物相关的生态安全性研究进展. 昆虫学报, 50(7): 727–736.]
- Li LB, Zhu Y, Jin SX, Zhang XL, 2014. Pyramiding Bt genes for increasing resistance of cotton to two major lepidopteran pests: *Spodoptera litura* and *Heliothis armigera*. *Acta Physiologiae Plantarum*, 36(10): 2717–2727.
- Li Z, Gao M, Liu RJ, Chang CY, Ge F, 2023. Effects on the yield and fiber quality components of Bt cotton inoculated with *Azotobacter chroococcum* under elevated CO<sub>2</sub>. *PeerJ*, 11: e15811.
- Li Z, Li L, Wei XW, Liu Y, Li LL, Lu ZB, Song YY, Wang GF, Men XY, 2024. Comparison of the ecological service value of different “green” and efficient cotton planting modes. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 61(4): 894–902. [李卓, 李蕾, 魏学文, 刘云, 李丽莉, 卢增斌, 宋莹莹, 王桂峰, 门兴元, 2024. 棉花绿色高效种植模式的生态服务价值评估. 应用昆虫学报, 61(4): 894–902.]
- Li Z, Wang XH, Saurav PS, Li CX, Zhao M, Xin SR, Parajulee MN, Chen FJ, 2019. Impacts of Bt maize inoculated with rhizobacteria on development and food utilization of *Mythimna separata*. *Journal of Applied Entomology*, 143(10): 1105–1114.
- Lu YH, 2012. Advance in insect pest management in Bt cotton worldwide. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 49(4): 809–819. [陆宴辉, 2012. Bt 棉花害虫综合治理研究前沿. 应用昆虫学报, 49(4): 809–819.]
- Qin QL, 2015. Rearing the cotton bollworm *Helicoverpa armigera* in the laboratory. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 52(2): 486–491. [秦启联, 2015. 棉铃虫饲养技术与流程. 应用昆虫学报, 52(2): 486–491.]
- Raju A, Meshram M, Chakraborty M, Singh JV, Majumdar G, Uma B, 2008. *Azotobacter* and *Azospirillum* in integrated nutrient management of hybrid cotton. *Journal of Soils & Crops*, 18: 245–250.
- Romeropdomo F, Abril J, Camelo M., 2017. *Azotobacter chroococcum* as a potentially useful bacterial biofertilizer for cotton (*Gossypium hirsutum*): Effect in reducing N fertilization. *Revista Argentina de Microbiologia*, 49(4): 377–383.
- Shi RY, Niu CY, Zhu YJ, 2015. Effects of formula fertilization on the nitrogen, phosphorus, potassium utilization and yield of cotton. *Shihezi Science and Technology*, 6(3): 1–4. [石荣媛, 牛长英, 朱拥军, 2015. 配方施肥对棉花氮肥、磷肥和钾肥利用率及产量的影响分析. 石河子科技, 6(3): 1–4.]
- Stitt M, Krapp A, 1999. The interaction between elevated carbon dioxide and nitrogen nutrition: The physiological and molecular background. *Plant Cell & Environment*, 22(6): 583–621.
- Su HH, Fan N, Li D, Yang YZ, 2010. Effect of Bt cotton on beet armyworm *Spodoptera exigua*. *Plant Protection*, 36(5): 1–5. [苏宏华, 范娜, 李达, 杨益众, 2010. 转 Bt 基因棉对甜菜夜蛾的影响. 植物保护, 36(5): 1–5.]
- Tang ZJ, Xie DY, Xu SM, Nie LH, Lu SP, Wang MK, 2023. Changes of insect resistance and its correlation analysis with yield traits in transgenic Bt cotton from 2005 to 2020. *Crops*, 2023(2): 77–82. [唐中杰, 谢德意, 许守明, 聂利红, 吕淑平, 王明坤, 2023. 2005–2020 年转 Bt 基因棉花抗虫性变化及其与产量性状的相关性分析. 作物杂志, 2023(2): 77–82.]
- Zhang X, Ma AL, Fang J, Xiao J, Luan N, Wang YH, Chen Y, Chen DH, 2010. Effect of GA<sub>3</sub> and DPC on Bt protein expression and boll nitrogen metabolism of Bt transgenic cotton. *Cotton Science*, 22(2): 150–156. [张祥, 马爱丽, 房静, 肖健, 峦娜, 王永慧, 陈源, 陈德华, 2010. 赤霉素和缩节胺对转 Bt 基因抗虫棉棉铃 Bt 蛋白表达及氮代谢的影响. 棉花学报, 22(2): 150–156.]