滅怀敏,李 刚,修伟明,等. 磷高效转基因水稻 OsPT4 种植对土壤细菌群落多样性的影响[J]. 农业环境科学学报, 2016, 35(3): 500-506. ZANG Huai-min, LI Gang, XIU Wei-ming, et al. Diversity of bacterial community in rice paddy soil grown with P-efficient transgenic rice(OsPT4)[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2016, 35(3): 500-506.

磷高效转基因水稻 OsPT4 种植对土壤 细菌群落多样性的影响

臧怀敏,李 刚,修伟明,魏琳琳,倪 土,杨殿林,赵建宁*

(农业部环境保护科研监测所,农业部产地环境质量重点实验室/天津市农业环境与农产品安全重点开放实验室,天津 300191)

摘 要:为探讨磷高效转基因水稻种植对土壤细菌多样性的影响,在小区试验条件下,以磷高效转基因水稻 OsPT4 为对象,以非转基因水稻 OsPT4 在整个生长期对土壤细菌群落丰富度、均匀度的影响。结果显示,同一处理、同一生长期内磷高效转基因水稻 OsPT4、磷高效突变体水稻 PHO2 为对照,设施磷和不施磷两种处理,采用 PCR-DGGE 测序技术,分析比较了磷高效转基因水稻 OsPT4、磷高效突变体水稻 PHO2 与常规水稻日本晴的土壤细菌 16S rDNA DGGE 指纹图谱基本相似;施磷处理条件下,PHO2 在拔节期较OsPT4、日本晴增加一条电泳条带,该条带属于蓝藻菌门(Cyanobacteria)藻青菌属(Cyanobacterium),OsPT4 在抽穗扬花期较日本晴缺失一条电泳条带,该条带属于芽单胞菌门(Genmatimonadetes);不施磷处理时,OsPT4 在分蘖期和成熟期较日本晴增加 4 条电泳条带,测序结果显示分别为变形菌门(Proteobacteria)地杆菌属(Geobacter)、厚壁菌门(Firmicutes)芽孢杆菌属(Bacillus)、绿弯菌门(Chloroflexi)、变形菌门(Proteobacteria)和地杆菌属(Geobacter)。研究表明,在水稻个别生长期,磷高效转基因水稻 OsPT4 对土壤细菌丰富度(S)、香农-威纳指数(H)和均匀度(E_H)产生显著影响。

关键词:磷高效转基因水稻;土壤细菌;PCR-DGGE;细菌多样性

中图分类号:S154.3 文献标志码:A 文章编号:1672-2043(2016)03-0500-07 doi:10.11654/jaes.2016.03.013

Diversity of bacterial community in rice paddy soil grown with P-efficient transgenic rice(OsPT4)

ZANG Huai-min, LI Gang, XIU Wei-ming, WEI Lin-lin, NI Tu, YANG Dian-lin, ZHAO Jian-ning*

(Key Laboratory of Original Agro-environment Quality, Ministry of Agriculture/Tianjin Key Laboratory of Agro-environment and Agroproduct Safety, Agro-Environmental Protection Institute, Ministry of Agriculture, Tianjin 300191, China)

Abstract: The effects of genetically modified crops(GMCs) on soil microbial community have been received more and more attentions in recent years. In this study, the effects of P-efficient transgenic rice(OsPT4) on richness and evenness of soil bacterial community were compared with parental OsPT4(*Nipponbare*) and P-efficient mutant rice(PHO2), using denaturing gradient gel electrophoresis(DGGE) technique. Two phosphorous(P) application rates(0 and 15 g·m⁻²) were used. The bacterial 16S rDNA DGGE fingerprintings had no significant differences in community structure between P-efficient transgenic rice, *Nipponbare* and P-efficientmutant rice at the same P rate during the same growing stage. Under P application, PHO2 had one more electrophoretic band than OsPT4 and *Nipponbare* did at the elongation stage. This increased band belonged to *Cyanobacterium* of Cyanobactteria. At the heading and flowering stages, OsPT4 had one less electrophoretic band than *Nipponbare* did. This missed band was a part of Gemmatimonadetes. Under no P application, OsPT4 emerged four electrophoretic bands during both tillering and maturing stages, as compared with *Nipponbare*. These four electrophoretic bands were associated with *Geobacter* of Proteobacteria, *Bacillus* of Firmicutes, Chloroflexi, and *Geobacter* of Proteobacteria. This study demonstrates that P-efficient transgenic rice(OsPT4) has significant effects on richness(S), Shannon-wiener index(H) and evenness(E_H) of soil bacteria at certain rice growth stages, and that P fertilizer may also be involved in these effects.

Keywords: P-efficient transgenic rice; soil bacteria; PCR-DGGE; bacterial diversity

收稿日期:2015-10-14

基金项目:国家自然科学基金(31301855)

作者简介:臧怀敏(1989—),女,硕士研究生。E-mail:zanghuaimin2010@163.com

^{*} 通信作者:赵建宁 E-mail:zhaojn2008@163.com

2016年3月 臧怀敏,等:磷高效转基因水稻 OsPT4 种植对土壤细菌群落多样性的影响

从 1996 年到 2014 年,全球转基因作物的种植面 积增加了 100 倍以上,转基因作物已经成为现代农业 史上推广最为迅速的农作物^[1]。据统计,2014 年全球 有 28 个国家种植转基因作物,面积超过 1.81 亿 hm²。 但是转基因作物在给人们带来巨大经济效益的同时, 其所带来的生态安全性问题也日益引起公众的广泛 关注^[2-4]。

磷高效转基因作物是通过生物技术手段培育出 的磷高效吸收、转运的作物新品种,用以克服因土壤 缺磷造成的作物缺磷问题^[5],与常规作物相比,其磷素 吸收、转运效率得到了显著提高。。磷高效转基因作物 因特有的磷素高效吸收和转运能力可以使其在土体 有效磷浓度较低的情况下吸收到更多的磷素,从而满 足作物的正常生长发育需要。磷高效转基因水稻 OsPT4 为南京农业大学资源与环境学院植物营养分 子生物学实验室通过转基因技术研制的磷高效吸收 水稻新材料,是通过克隆水稻家族的 pht1 家族成员 OsPT4 基因,并将其导入日本晴而获得的超表达材 料,在水培正常供磷条件下,地下部全磷含量较对照 增加 10%~20%, 地上部全磷含量增加 36%~50%;在 水培低磷条件下,地下部全磷含量较对照增加8%~ 15%,地上部全磷含量增加15%~30%^[7-8]。磷高效突变 体材料 PHO2 是编码 OsLTN1 基因发生无义突变产 生的磷高效吸收材料,该突变体材料增加了水稻磷素 的吸收和转运能力,并且使磷素在新叶部位累积⁹⁹。

土壤磷库长期处在一个动态的平衡状态,磷高效转基因水稻对土壤磷素高效吸收利用的同时,可能会引起土壤磷库的变化,进而会对土壤细菌群落结构产生一定的影响。土壤微生物群落多样性与土壤功能密切相关,土壤环境的改变会直接引起微生物群落结构变化¹⁰⁰。因此,磷高效转基因水稻在提高自身对土壤磷素高效吸收利用的同时,是否对土壤细菌多样性产生影响还不得而知。目前,有关磷高效转基因作物种植对土壤细菌多样性影响的报道较少。本研究主要利用 PCR-DGGE 方法,研究磷高效转基因水稻 OsPT4的种植对土壤细菌群落多样性的影响,为该磷高效转基因水稻新材料将来的应用及其环境安全性评价提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 试验地概况与试验设计

试验地位于农业部环境保护科研监测所网室内, 种植小区为长、宽、深均为1m的水泥池,池内填充采 自天津津南区的潮土,部分基本理化性质如下:全磷 含量 1.19 g·kg⁻¹, 全氮含量 0.96 g·kg⁻¹, 有机质含量 24.55 g·kg⁻¹, pH8.21。

试验设不施磷和施磷 15 g·m⁻² 两个处理,各 5 次 重复。磷源为 KH₂PO₄,全部用作基肥。以尿素和硫酸 钾作为 N、K 源,施氮 20 g·m⁻²,其中 50%作为基肥 于种植前施用,50%作追肥施用,施钾 18 g·m⁻² 全部 用作基肥。

1.2 供试材料

试验所用水稻为磷高效转基因水稻 OsPT4、磷高 效突变体水稻 PHO2 及其非转基因亲本水稻材料日 本晴,均由南京农业大学资源与环境科学学院植物营 养分子生物学实验室提供。

1.3 土壤样品采集

水稻种子于 2014 年 5 月 20 日播种在培养盘中, 每孔 5 粒,于 7 月 1 日移苗,每个水泥池内移栽水稻 30 株。在水稻分蘖期、拔节期、抽穗扬花期和成熟期 分别采集土样。采集时,去除表面杂草和枯枝落叶,分 别在各水泥池内选取 3 株水稻,用直径 3.5 cm 的土 钻在距水稻主茎 2 cm 处取 20 cm 深的土样,并将各 个采样区的样品分别混合,鲜土样置于-20 ℃冰箱, 用于土壤细菌群落多样性分析,另一部分经风干、研 磨、过筛用于土壤理化性质的测定。

1.4 测定方法

1.4.1 土壤总 DNA 提取

采用 MoBio 公司的 Powerlyzer powersoil DNA isolation kit(MoBio laboratories, SolanaBeach, CA, USA) 试剂盒,取 0.5g鲜土置于 Glass Bead Tube 中,按操 作说明逐步进行提取,提取到土壤的 DNA 用 1.0%的 琼脂糖凝胶检测样品质量,提取的 DNA 于-20 ℃ 保存。

1.4.2 PCR 扩增

将土壤 DNA 采用细菌 16S rDNA V3 可变区通 用引物 341f-GC(5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3') 和534r(5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3')进行 PCR 扩 增^[11],5'端 GC 夹序列 CGCCCGCGCGCGCGGGGGGG CGGGGCGGGGGGGCACGGGGGG。PCR 反应体系为 50 μ L(两种引物各 1.0 μ L, Premix Ex Taq 25 μ L,稀释 2 倍的土壤 DNA 模板 1.0 μ L, 用灭菌水补足至 50 μ L)。PCR 反应条件为:95 °C预变性 5 min;94 °C变性 1 min,57 °C退火 1 min,72 °C延伸 2 min,35 个循环; 72 °C延伸 5 min。PCR 产物用 1.5%的琼脂糖凝胶电泳 进行检测。

农业环境科学学报 第35卷第3期

1.4.3 DGGE 检测和条带回收

PCR 产物采用 Bio-Rad 公司的 Dcode[™] 通用突 变检测系统(Bio-Rad,USA)按照操作说明进行检 测。主要步骤如下:浓度为 8%聚丙烯酰胺,变性梯度 为 40%~60%,60 ℃预热,将 30 µL PCR 产物与 15 µL 6×loading buffer 混合后用微量进样器加入胶孔,先在 60 ℃、60 V 恒定电压下预跑 60 min,然后在 60 ℃、100 V 电泳 12 h。电泳完毕后用 SYBR R Green1(1: 10 000)染色 30 min,再用 Gel Dox XR 凝胶成像系统 (Bio-Rad)进行观察与拍照。然后在紫外灯下对图谱 的特异条带和优势条带进行割胶,切割回收的条带置 于 1.5 mL 灭菌管内,加 500 µL 去离子水 4 ℃过夜。 1.4.4 DGGE 条带纯化和克隆

回收处理过的条带用 341f 和 534r 引物进行扩 增。将扩增产物割胶回收,用 Wizad[®] SV Gel and PCR Clean–Up system 试剂(Progema, USA)纯化,并与 载体 pGEM–T Easy Vector(Progema, USA)连接转化, 挑取培养后的白色菌落,接种到液体培养基中,37℃ 摇床培养 10 h。

1.4.5 测序及序列比对

分别吸取各样品菌液 1 mL,用 T7 和 SP6 两种引物进行测序(由上海生工生物工程技术服务有限公司完成)。将测序得到的 DNA 序列与 NCBI 数据库中已有的序列进行比对,获得相近的典型菌株序列。

1.5 数据分析

采用 SPSS 17.0(Duncan's test)对试验数据进行

分析,采用 Quantity One 4.6.2 软件进行数字化处理并进行聚类分析。各样品用香农-维纳指数(Shannon-Wiener index,H)、均匀度(Evenness index, E_H)和丰富度(Richness,S)评价细菌多样性的变化,其计算公式如下:

$$H = -\sum_{i=1}^{S} P_i \ln P_i; E_H = H/\ln S$$

式中:H代表香农-威纳指数;P_i代表第 *i* 条带占总强度的比值;E_H代表均匀度指数;S代表条带数量或丰富度。

2 结果与分析

2.1 DGGE 图谱分析

对 16S rDNA 产物 DGGE 指纹图谱(图 1)分析表 明:施磷处理时,在不同生长期内,磷高效转基因水稻 OsPT4 和非转基因水稻日本晴、PHO2 的 DGGE 指纹 图谱间有较大的相似性,多数为共有条带,表明这些 条带代表的土壤细菌类群比较稳定,不受水稻品种的 影响。OsPT4 仅在抽穗扬花期与日本晴有 1 条差异条 带(图 1C 箭头所示),PHO2 在拔节期与日本晴有 1 条差异条带(图 1B 箭头所示)。

在施磷处理的不同生长期内,土壤细菌丰富度在 各生长期内均呈现升-降-升的变化趋势,三个品种的 土壤细菌丰富度在抽穗扬花期均为最低。OsPT4、 PHO2 在拔节期和成熟期的土壤细菌香农-维纳指 数与日本晴相比具有显著差异,OsPT4 与 PHO2、日



Figure 1 DGGE profile in soil grown with different rice varieties under phosphate fertilizer application

本晴的均匀度指数仅在拔节期具有显著差异(表1)。

不施磷条件下,对 16S rDNA 产物 DGGE 指纹图 谱(图 2)分析表明:不同生长期内,OsPT4 和日本晴、 PHO2 的 DGGE 指纹图谱有较大的相似性,多数条带 为共有条带,表明这些条带代表的土壤细菌类群也比 较稳定,也不受水稻品种的影响。但在分蘖期和成熟 期出现了差异性条带。在水稻分蘖期,OsPT4 与日本 晴相比,增加三条差异条带(图 2B);在水稻成熟期, OsPT4 与PHO2、日本晴相比,增加一条差异条带(图2D)。

不施磷处理的水稻在各个生长期内,土壤细菌丰 富度均呈现先升高后降低的趋势(表 2),三个水稻品 种的丰富度指数均在水稻抽穗扬花期最低。OsPT4 的 香农-维纳指数与日本晴相比,在分蘖期、拔节期、成 熟期显著增加;在抽穗扬花期 OsPT4、PHO2 的均匀度 指数与日本晴相比显著增加。

2.2 土壤样品细菌差异性条带序列比对分析

根据土壤细菌 DGGE 图谱数字化结果,分别选 择施磷处理 DGGE 凝胶上主要条带 36条(8~42)、不 施磷处理 DGGE 凝胶上主要条带 43条(a1~a43)和差 异性条带 6条(1~6)进行割胶纯化、连接转化后测序, 条带位置如图 1、图 2所示。将 6条特异性条带测序结 果在 NCBI 数据库中进行 Blast 比对,将匹配度高的 序列作为比对结果,如表 3所示,施磷处理时,PHO2在 拔节期的差异条带为 1(Uncultured Cyanobacterium), 属于蓝藻菌门(Cyanobactteria)藻青菌属(Cyanobacterium); OsPT4 在抽穗扬花期缺失的条带为条带 2(Uncultured Gemmatimonadetes bacterium),属于芽 单胞菌门(Gemmatimonadetes);不施磷处理时,磷高 效转基因水稻 OsPT4 在分蘖期增加的条带自下而上 依次为:条带 3(Uncultured Geobacter sp.),属于变形 菌门(Proteobacteria)地杆菌属(Geobacter);条带 4 (Bacillus sp.),属于厚壁菌门(Firmicutes)芽孢杆菌属 (bacillus);条带 5 为 (Uncultured Chloroflexi bacteri um)属于绿弯菌门(Chloroflexi);OsPT4 在水稻成熟期 增加的条带为条带 6(Uncultured Geoalkalibacter sp.), 属于变形菌门(Proteobacteria)地杆菌属(Geobacter)。 除条带 4 外,其余条带均属于不可培养微生物。

3 讨论

转基因作物外源蛋白可以通过根系分泌物、作物 残茬和花粉传播等多条途径进入土壤^[12],可能对土壤 微生物的种类、数量以及多样性产生一定影响。因此, 随着转基因作物的大面积种植,转基因作物对土壤微 生物多样性的潜在影响越来越受到关注。Kim 等^[13]使 用 PCR-DGGE 方法对 Iksan 483、Milyang 204 两种转 基因水稻和四种非转基因水稻进行研究,指出转基因 水稻种植对土壤细菌群落没有显著影响,但是在 8 月 到 12 月之间土壤细菌群落显示出季节性的差异。宋 亚娜等^[14]通过连续两年种植转 cry1Ac/cpti 双价抗虫 基因水稻,发现一定时期内转基因水稻种植对土壤氨 氧化细菌的群落组成和丰度没有显著影响。有些研究 同样发现转基因作物种植对土壤微生物多样性不产

表 1	施磷处理不同生长期不同水稻材料土壤细菌	DGGE 图谱多样性指数分析
-----	---------------------	----------------

Table 1 Shannon-Wiener index, richness and evenness of soil bacteria of different rice varieties under phosphate fertilizer application

生长期 Growth stage	品种 Rice variety	丰富度(S) Richness	香农-威纳指数(H) Shannon-Wiener index	均匀度指数(E _H) Evenness
分蘖期 Tillering stage	日本晴	34.33±1.73a	3.47±0.38a	0.98±0.01a
	OsPT4	35.67±0.58a	3.63±0.31a	0.98±0.00a
	PHO2	$25.33\pm0.58b$	3.03±0.17a	0.98±0.00a
拔节期 Elongation stage	日本晴	$34.00\pm2.52ab$	3.61±0.18a	$0.98 \pm 0.00 \mathrm{b}$
	OsPT4	27.33±1.53b	2.82±0.17b	0.99±0.00a
	PHO2	41.67±1.53a	3.61±0.28a	0.99±0.00a
抽穗扬花期 Heading and flowering stage	日本晴	$15.00 \pm 2.65 \mathrm{b}$	2.59±0.25a	0.97±0.00a
	OsPT4	17.67±3.06ab	2.49±0.48a	0.97±0.00a
	PHO2	23.33±1.53a	3.19±0.25a	0.97±0.00a
成熟期 Maturing stage	日本晴	$21.67{\pm}2.08{\rm b}$	2.63±0.11b	0.98±0.01a
	OsPT4	25.33±3.06a	3.09±0.28a	0.98±0.00a
	PHO2	24.00±1.73ab	2.95±0.15ab	0.99±0.00a

注:同一生长期不同小写字母表示各水稻材料间差异显著(P<0.05)。下同。

Note: Different lowercase letters in the same stage indicate significant (P<0.05) difference between different rice varieties. The same below.

农业环境科学学报 第35卷第3期



图 2 不施磷处理不同水稻生长期不同土壤样品 DGGE 指纹图谱

Figure 2 DGGE profile in soil grown with different rice varieties without phosphate fertilizer application

表 2 不施磷处理不同生长期不同水稻材料土壤细菌 DGGE 图谱多样性指数分析

Table 2 Shannon-Wiener index, richness and evenness of soil bacteria of different rice varieties without phosphate fertilizer application

生长期 Growth stage	品种 Rice variety	丰富度(S) Richness	香农-威纳指数(H) Shannon-Wiener index	均匀度指数(E _H) Evenness
分蘖期 Tillering stage	日本晴	$30.00 \pm 3.61 \mathrm{b}$	$3.44\pm0.29\mathrm{b}$	0.98±0.00a
	OsPT4	42.67±3.46 a	4.39±0.29a	0.98±0.00a
	PHO2	48.67±3.21 a	4.73±0.13a	0.98±0.00a
拔节期 Elongation stage	日本晴	$26.00 \pm 1.73 \mathrm{b}$	$2.96 \pm 0.10 \mathrm{b}$	0.98±0.00a
	OsPT4	32.33±2.52a	3.74±0.19a	0.98±0.00a
	PHO2	21.67±1.15b	2.70±0.22b	0.98±0.00a
抽穗扬花期 Heading and flowering stage	日本晴	16.33±0.58b	2.76±0.06a	$0.97 \pm 0.00 \mathrm{b}$
	OsPT4	19.67±0.58a	2.82±0.06a	0.98±0.00a
	PHO2	18.00±2.65ab	2.52±0.34a	0.98±0.00a
成熟期 Maturing stage	日本晴	31.00±0.00a	2.83±0.64b	0.98±0.00a
	OsPT4	$19.33 \pm 3.21 \mathrm{b}$	4.26±0.18a	0.98±0.01a
	PHO2	23.33±0.58b	3.28±0.12ab	0.98±0.00a

表 3 DGGE 带的确认及根据测序结果推测的 DGGE 带代表的细菌

Table 3 Identification of DGGE's bands and closest match of corresponding bacteria based on sequencing results

序号 Serial number	GenBank 中最匹配菌株 Matching bacterial strain in GenBank	菌类 Fungus	同一性 Identity/%	登录号 Accession number
1	Uncultured Cyanobacterium clone 19A	Cyanobactteria	100	KM892905.1
2	Uncultured Gemmatimonadetes bacterium clone T2KB-C1	Gemmatimonadetes	93	HG325756.1
3	Uncultured Geobacter sp.clone Geo06–Gb564F	Proteobacteria	100	AM712168.1
4	Uncultured Bacillus sp.DB14832	Firmicutes	100	KP670301.1
5	Uncultured Chloroflexi bacterium AKYG1722	Chloroflexi	94	AY921935.1
6	Uncultured Geoalkalibacter sp.clone C-160	Proteobacteria	99	JX415464.1

生显著影响[15-16],然而也有研究得出不同的结论。陈丽 华等问通过室内秸秆还田模拟试验研究广谱抗真菌 蛋白转基因水稻对土壤真菌群落的影响,指出在秸秆 还田前期(40d),转基因秸秆处理的土壤和非转基因 秸秆处理的土壤其真菌群落结构存在显著差异,而在 处理后期(50~90 d)则不存在差异,说明转基因水稻 对土壤群落结构存在影响,虽然这种影响是短暂的。 Castaldini 等^[18]在温室环境种植转 Bt 基因玉米和非转 基因玉米,发现种植转 Bt 基因玉米对土壤微生物群 落结构、分布及活性产生了显著影响。

本试验中,从香农-威纳指数来看,两种不同处 理,在水稻生长的拔节期和成熟期,OsPT4与PHO2、 日本晴之间都存在显著差异(P<0.05);从均匀度指数 来看,仅在施磷处理的拔节期和不施磷处理的抽穗扬 花期,OsPT4、PHO2与对照日本晴之间存在显著差异 (P<0.05),其余时期未发现显著差异;从土壤细菌的 丰富度来看,两种不同处理时,三种水稻的土壤细菌 丰富度都呈现先降后升的趋势,且在抽穗扬花期土壤 细菌丰富度最低,同一处理同一时期磷 OsPT4 的土 壤细菌丰富度比日本晴高,但差异不显著,可能是由 于磷高效转基因水稻在将土壤中更多的磷转化为植 株可吸收利用形态的同时,也使得土壤中与磷形态有 关的细菌类群增加。

综上所述,在水稻生长的不同时期,磷高效转基 因水稻对土壤细菌多样性的影响也不同。这与陈晓雯 等19的研究一致,她通过田间试验研究2种转基因水 稻对土壤微生物群落结构的影响,指出仅在水稻生长 旺盛期对土壤微生物群落有显著影响,在水稻抽穗期 和成熟期则没有显著影响。金凌波等四也同样发现磷 高效转基因大豆与非转基因大豆的土壤微生物数量 和群落多样性存在一些差异,但这种因磷高效转基因 大豆种植所产生的影响却不如生育期和季节变化对 土壤微生物数量和群落产生的影响大。

从 DGGE 图谱可以看出三种水稻土壤细菌群落 有很强的相似性,仅存在个别条带亮度不同及6条差 异性条带。差异性条带克隆结果显示,OSPT4 增加的 4条差异条带分别为:地杆菌属(2条)、芽孢杆菌属(1 条)、绿弯菌门(1条),说明在水稻生长旺盛期磷高效 转基因水稻使得土壤中的地杆菌属、芽孢杆菌属以及 绿弯菌门丰富度增加。地杆菌属属于δ-变形菌门(δ-Proteobacteria)地杆菌科(Geobacteraceae),是各种地 下沉积环境的优势物种,它具有修复污染环境的能 力[21-22];芽孢杆菌属是最大的细菌属,包括276个种和 7个亚种,它可以降解土壤中难溶的化合物,固定空 气中的氮[23-24];绿弯菌门普遍存在于各种自然环境和 特定环境中,是有机质富集的地下水生物圈最大的细 菌群,在生态系统中发挥不可或缺的作用^[2]。施肥时, OsPT4 缺失的条带属于芽单胞菌门,广泛存在于陆地 生态系统,但其在土壤微生物群落中所占的比例仅为 2%左右,并且因为缺乏合适的培养条件对其生态功 能所知甚少^[20]。同样,El-chakhtoura等^[27]指出芽单胞 菌门占微生物群落比例较小,不能确定影响其群落的 具体因素。

影响土壤微生物群落多样性的因素有很多,如作 物种类、根系分泌物、土壤类型及养分状况和耕作方 式等^[28],这些因素间往往存在相互作用,某一因素的 改变通常会导致其他因素的改变,最终影响到土壤微 生物的群落结构。因此,要研究磷高效转基因水稻对 土壤细菌多样性的影响,还需要对多因素间的相互作 用进行研究。本研究是通过室外小区试验进行的短期 研究,得出磷高效转基因水稻的种植在个别生长期对 土壤细菌群落多样性有影响,然而多数是未培养的土 壤细菌。鉴于土壤细菌数量众多,且种类复杂,磷高效 转基因水稻长期种植是否对土壤细菌群落多样性产 生影响,还需要进行长期的田间试验进一步研究。

4 结论

磷高效转基因水稻 OsPT4 各生长期的土壤细菌 丰富度与 PHO2、日本晴规律一致,均呈现先降后升 的趋势,且最小值出现在水稻的抽穗扬花期;与日本 晴、PHO2相比,OsPT4种植在水稻的拔节期、成熟期 对香农-维纳指数存在显著影响;与日本晴相比, OsPT4、PHO2 种植仅在施磷处理的拔节期和不施磷 处理的抽穗扬花期对均匀度指数产生显著影响。总 之,磷高效转基因水稻对土壤细菌多样性的影响因水 稻生长期、施肥处理的不同而有所差异。

参考文献:

- [1] James C. 2014 年全球生物技术/转基因作物商业化发展态势[J]. 中 国生物工程杂志,2015,35(1):1-14. James C. Global biotech/GM crops commercialization development situation in 2014[J]. China biotechnology, 2015, 35(1):1-14.
- [2] 卢荣宝, 夏 辉. 转基因植物的环境生物安全: 转基因逃逸及其潜在 生态风险的研究和评价[J]. 生命科学, 2011, 23(2):186-194. LU Bao-rong, XIA Hui. Environmental biosafety of transgenic plants: Research and assessment of transgene escape and its potential ecological impacts[J]. Chinese Bullettin of Life Sciences, 2011, 23(2):186-194.

- [3] Neher D, Muthumbi A W N, Dively G P. Impact of coleopteran-active Bt corn on non-target nematodecommunities in soil and decomposing corn roots[J]. Soil Biology & Biochemistry, 2014, 76:127–135.
- [4] Tan F X, Wang J W, Chen Z N, et al. Assessment of the arbuscular mycorrhizal fungal community in roots and rhizosphere soils of *Bt* corn and their non-*Bt* isolines[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2011, 43:2473– 2479.
- [5] Roger A, Libohova Z, Rossier N, et al. Spatial variability of soil phosphorus in the Fribourgcanton, Switzerland[J]. *Geoderma*, 2014, 217–218: 26–36.
- [6] Hu B, Zhu C G, Li F, et al. LEAF TIP NECROSIS1 plays a pivotal role in regulation of multiple phosphate starvation responses in rice[J]. Plant Physiology, 2011, 156(3):1101–1115.
- [7] Zhang F, Sun Y F, Pei W X, et al. Involvement of OsPht1;4 in phosphate acquisition and mobilization facilitates embryo development in rice[J]. The Plant Journal, 2015, 82:556–569.
- [8] 吴 娜. 水稻磷转运蛋白 OsPT4 的生理功能鉴定[D]. 南京:南京农业大学, 2011.
 WU Na. Physilogical functional identification of rice phosphate trans-

porter OSPT4[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2011.

[9] Aung K, Lin S I, Wu C C, et al. PHO2, a phosphate overaccumulator, is caused by a nonsense mutation in a MicroRNA399 Target Gene[J]. *Plant Physiology*, 2006, 141:1000–1011.

[10] 张 晶, 张惠文, 李新宇, 等. 土壤微生物生态过程与微生物功能基因多样性[J]. 应用生态学报, 2006, 17(6):1129-1132.
ZHANG Jing, ZHANG Hui-wen, LI Xin-yu, et al. Soil microbial ecological process and microbial functional gene diversity[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2006, 17(6):1129-1132.

- [11] Proietti P, Federici E, Fidati L, et al. Effects of amendment with oil mill waste and its derived –compost on soil chemical and microbiological characteristics and olive(*Oleaeuropaea* L.) productivity[J]. *Agriculture*, *Ecosystems and Environment*, 2015(207):51–60.
- [12] 刘文娟, 刘 勇. 转 Bt 基因作物毒素蛋白对土壤生态的影响[J]. 中国测试, 2009, 35(6):92-96.
 LIU Wen -juan, LIU Yong. Impact of toxin proteins released from transgenic Bt crops on soil ecosystems[J]. China Measurement & Test, 2009, 35(6):92-96.
- [13] Kim M C, Ahn J H, Shin H C, et al. Molecular analysis of bacterial community structures in paddy soils for environmental risk assessment with two varieties of genetically modified Rice, Iksan 483 and Milyang 204[J]. *Biotechnol*, 2008, 18(2):207–218.
- [14] 宋亚娜, 苏 军, 林 艳, 等. 转 *crylAclepti* 基因水稻对土壤氨氧 化细菌群落组成和丰度的影响[J]. 生物安全学报, 2012, 21(1):67-73.

SONG Ya-na, SU Jun, LIN Yan, et al. Effect of *cry1Ac/cpti* transgenic rice on community composition and abundance of ammonia-oxidizing bacteria in paddy soil[J]. *Journal of Biosafety*, 2012, 21(1):67–73.

- [15] 李 刚, 赵建宁, 杨殿林. 抗草甘膦转基因大豆对根际土壤细菌多样性的影响[J]. 中国农学通报, 2011, 27(1):100-104.
 LI Gang, ZHAO Jian-ning, YANG Dian-lin. Effects of glyphosate resistant transgenic soybean on bacterial diversity in rhizospheric soil[J]. *Chinese A gricultural Science Bulletin*, 2011, 27(1):100-104.
- [16] Fang H, Dong B, Yan H, et al. Effect of vegetation of transgenic Bt rice

lines and their straw amendment on soil enzymes, respiration, functional diversity and community structure of soil microorganisms under field conditions[J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2012, 24(7):1259– 1270.

[17] 陈丽华, 吕 新, 林碧娇, 等. 广谱抗真菌蛋白转基因水稻秸秆模拟 还田对土壤真菌群落结构的影响[J]. 中国生态农业学报, 2015, 23 (1):87-94.

CHEN Li-hua, LÜ Xin, LIN Bi-jiao, et al. Effects of simulated straw return of transgenic rice expressing broadspectrum antifungal proteins on soil fungal community structure[J]. *Chinese Journal of Eco-Agricul-ture*, 2015, 23(1):87–94.

- [18] Castaldini M, Turrini A, Sbrana C, et al. Impact of Bt corn on rhizospheric and soil eubacterial communities and on beneficial mycorrhizal symbiosis in experimental microcosms[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(11):6719–6729.
- [19] 陈晓雯,林 胜,尤民生,等.转基因水稻对土壤微生物群落结构及 功能的影响[J]. 生物安全学报, 2011, 20(2):151-159.
 CHEN Xiao-wen, LIN Sheng, YOU Min-sheng, et al. Effects of transgenic rice on the structure and function of soil microbial communities
 [J]. Journal of Biosafety, 2011, 20(2):151-159.
- [20] 金凌波,周 峰,姚 涓,等. 磷高效转基因大豆对根际微生物群落的影响[J]. 生态学报, 2012, 32(7):2082-2090.
 JIN Ling-bo, ZHOU Feng, YAO Juan, et al. Effects of P-efficient transgenic soybean on rhizosphere microbial community[J]. Acta Ecologica Sinica, 2012, 32(7):2082-2090.
- [21] Tran H T, Krushka J, Antommattei F M, et al. Comparative genomics of Geobacter chemotaxis genes reveals diverse signaling function[J]. BMC Genomics, 2008, 9. doi: 10.1186/1471-2164-9-471.
- [22] Aklujkar M, Young N D, Holmes D, et al. The genome of Geobacter bemidjiensis, exemplarfor the subsurface clade of Geobacter species that predominate in Fe(Ⅲ)-reducing subsurface environments[J]. BMC Genomics, 2010, 11. doi: 10.1186/1471-2164-11-490.
- [23] Kim H J, Park C S, Lee S, et al. *Bacillus cheonanensis* sp. nov. isolated from near poultry farm soil[J]. *Journal of Microbiology*, 2014, 52(7): 554–558.
- [24] 龚国淑, 唐志燕, 邓香洁, 等. 成都郊区土壤芽孢杆菌的空间分布及 其多样性[J]. 生态学杂志, 2009, 28(10):2009-2013.
 GONG Guo-shu, TANG Zhi-yan, DENG Xiang-jie, et al. Spatial distribution and species diversity of soil *Bacillus* spp. in Chengdu suburbs
 [J]. *Chinese Journal of Ecology*, 2009, 28(10):2009-2013.
- [25] Yamada T, Sekiguchi Y. Cultivation of uncultured *Chloroflexi* subphyla:Significance and ecophysiology of formerly uncultured *Chloroflexi* 'subphylum i' with natural and biotechnological relevance[J]. *Mi*crobes Environ, 2009, 24(3):205-216.
- [26] DeBruyn J M, Nixon L T, Fawaz M N, et al. Global biogeography and quantitative seasonal dynamics of Gemmatimonadetes in soil[J]. *Applied* and Environmental Microbiology, 2011, 77(17):6295–6300.
- [27] El-Chakhtoura J, Prest E, Saikaly P, et al. Dynamics of bacterial communities before and after distribution in a full-scale drinking water network[J]. Water Research, 2015, 74: 180–190.
- [28] Dey R, Pal K K, Tilak K V B R. Influence of soil and plant types on diversity of rhizobacteria[J]. Proceedings of the National Academy of-Sciences, 2012, 82(3):341–352.