

抗盐碱转基因大豆对根际与非根际土壤 氨氧化古菌多样性的影响

宋立娟, 王宏燕*, 李传宝, 刘佳宾, 刘朴方

(东北农业大学资源与环境学院, 哈尔滨 150030)

摘要:采用 PCR—DGGE 技术,研究了抗盐碱转基因大豆(SRTS)对根际与非根际土壤氨氧化古菌(AOA)群落多样性的影响。结果表明,在非根际土壤中,SRTS 的氨氧化古菌 DGGE 条带数、多样性指数显著高于其受体亲本黑农 35 和其他两种大豆处理,而均匀度指数较低;在根际土壤中,SRTS 的 DGGE 条带数和多样性指数均高于其受体亲本,但并不显著,其均匀度指数则显著高于其他处理;每种大豆自身根际与非根际比较显示,SRTS 非根际氨氧化古菌 DGGE 条带数、多样性指数明显高于根际,均匀度指数却低于根际,而其受体亲本与其他两个处理反之。聚类分析结果表明,SRTS 的 DGGE 带谱与其他大豆处理差异较大,且自身非根际与根际处理差异显著,与其受体亲本黑农 35 相似性很低。测序结果表明,在 SRTS 处理中特有条带 12、15 和优势条带 13、14 均属于 *Uncultured crenarchaeote*。在盐碱土壤生态系统中,SRTS 提高了非根际土壤氨氧化古菌群落的多样性,但对根际土壤中氨氧化古菌的群落多样性有一定的抑制作用。

关键词:抗盐碱转基因大豆;多样性;根际土壤;非根际土壤;氨氧化古菌

中图分类号:S154.36 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-2043(2011)10-2091-08

Effects of Salinization Resistance Transgenic Soybeans (SRTS) on the Diversity of Ammonia Oxidizing Archaea (AOA) in Rhizosphere Soil and Non-rhizosphere Soil

SONG Li-juan, WANG Hong-yan*, LI Chuan-bao, LIU Jia-bin, LIU Pu-fang

(Resources and Environment Sciences College, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: The use and development of genetically modified soybeans has been a topic of considerable public debate in recent years. The majority of studies addressing potential risks of soybeans cultivation have addressed only aboveground effects. But, recent methodological advances in soil microbial have allowed research focus to move underground to try to gain knowledge of soybeans-driven effects on the microbial communities and processes in soil system. In order to deeply understand the effect of salinization resistance transgenic soybeans (SRTS) on the diversity of rhizosphere ammonia oxidizing archaea (AOA) and non-rhizosphere AOA in saline-alkali soil system, PCR-DGGE cloning was used. The main conclusions were shown as follow: The results of DGGE fingerprint showed that the AOA bands' number and the diversity indexes of SRTS in rhizosphere soil and non-rhizosphere soil were all higher than its recipient parent HeiNong-35, but it was not significant in rhizosphere soil treatment, and the AOA diversity indexes in non-rhizosphere soil of SRTS were significantly higher compared with its rhizosphere soil treatment, while the recipient parent HeiNong-35 and other two treatments were completely opposite. Cluster analysis demonstrated that fingerprint of SRTS was different from other treatments, and its non-rhizosphere and rhizosphere soil treatments were different, which indicated that SRTS might change the AOA communities in the soil. The experimental results of DGGE-cloning showed the sequences of SRTS unique band 12 and 15, prevailing bands 13 and 14 were all belong to *Uncultured crenarchaeote*. The study revealed that the SRTS treatment increased the communities' diversity of AOA in rhizosphere soil and brought an inhibiting effect on the communities' diversity of AOA in non-rhizosphere soil.

Keywords: Salinization Resistance Transgenic Soybeans (SRTS); diversity; rhizosphere soil; non-rhizosphere soil; Ammonia oxidizing archaea (AOA)

收稿日期: 2011-01-19

基金项目: 转基因生物新品种培育重大专项: 抗盐碱转基因大豆对大豆-土壤系统生物安全性影响研究 (2009ZX08011-025B)

作者简介: 宋立娟 (1982—), 女, 黑龙江人, 在读硕士, 主要研究方向为土壤微生物生态学。E-mail: song_lajuan@163.com

* 通讯作者: 王宏燕 E-mail: why220@126.com

抗盐碱转基因大豆是黑龙江农业科学院利用基因工程技术将甜菜碱醛脱氢酶基因(BADH)转化栽培大豆黑农 35, 培育出了抗盐碱转基因大豆品系(Salinization Resistance Transgenic Soybeans, 简称SRTS)。抗盐碱转基因大豆在大庆-安达地区封闭试种亩产量可达 125~150 kg, 产量潜力巨大, 如果能够大面积推广种植抗盐碱转基因大豆, 将大大提高盐碱土大豆产量。但是将抗盐碱转基因大豆释放到农田后的风险与生态安全性不容忽视, 转基因大豆根系分泌物中存在不同于其他作物根系分泌物的成分是其的一个重要方面。Fang 等指出, 与非转基因作物相比, 转基因作物的根系分泌物对土壤中细菌多样性有负面影响^[1]。徐广惠得出抗草甘膦转基因大豆不仅降低了根际土壤细菌的数量, 而且降低了土壤细菌多样性, 这可能与抗草甘膦转基因大豆和传统大豆非根际分泌物成分的不同有关^[2]。自从 2005 年 Konneke 等从热带海洋水族馆鱼缸里的岩石土壤底层中分离出一株氨氧化古细菌(AOA)起, AOA 已越来越多地受到人们的关注。在土壤生态系统中, AOA 分布广泛, 其 *amoA* 基因数量最高可达氨氧化细菌(AOB)的 3 000 倍^[3], 是硝化作用能菌之一。综合比较, AOA 才是地球上最丰富的氨氧化生物^[4], 其多样性分布的变化对土壤养分分配、氮素循环有重要影响。

本研究采用 PCR 与 DGGE-cloning 相结合的方法, 对种植抗盐碱转基因大豆(SRTS)的根际与非根际土壤中氨氧化古菌多样性进行比较研究, 为转基因大豆生物安全性评价提供基础研究资料。

1 材料与方法

1.1 研究区域概况

试验地点位于黑龙江省哈尔滨市东北农业大学试验基地(N45°34', E126°22'), 气候属于寒温带大陆性气候, 年降水量 400~600 mm 之间, 无霜期平均气温 3.78 °C, 平均有效积温 2 800 °C。供试土壤取自黑龙江省安达市, 为盐碱土, 不施用化肥和农药, 其理化性状如下: 速效钾 149.95 mg·kg⁻¹, 有机质 61.55 g·kg⁻¹, 速效磷量 26.68 mg·kg⁻¹, 全氮 1.68 g·kg⁻¹, 钠吸附比 0.38, 土壤中水溶性碳酸氢根 0.002 cmol·kg⁻¹, 碱化度 0.04, pH 值 8.44, 阳离子交换量 13.94 cmol(+)·kg⁻¹, 交换性钠 0.55 cmol(Na)·kg⁻¹。

1.2 试验设计

试验设计为室外盆栽, 4 个处理, 4 次重复。试验材料为 4 种大豆, 分别为抗盐碱转基因大豆(SRTS)、

抗线王(K-W)、受体亲本黑农 35(SRTS-S)和野生大豆(*Glycine soa*)(Y-S)。春季播种, 各处理在种植及管理过程中只补充降水, 不施用化肥和农药。

1.3 试验样品采集

在夏季大豆盛花期采集土壤样品, 将根际和非根际土样带回实验室, 迅速去除石块、动物和植物残体, 过 2 mm 筛, 混合均匀后取 150 g 左右置于无菌自封袋中, -20 °C 冰箱内保存待用。样品采集方法如下^[5]。

根际土壤(Rhizosphere Soil)采集: 在以大豆植株为圆心、0.13 m 为半径的圆形区域内取出大豆植株及 0~20 cm 深的土壤, 紧握大豆植株靠地面部分, 轻轻抖落附在根上的土壤, 抖动约 1 min 后仍附着于根系上的土壤即为根际土壤。将其小心取下, 同一处理的根际土壤充分混匀, 得到该处理的根际土壤样品。

非根际土样(Non-rhizosphere Soil)采集: 在各处理盆栽的大豆植株行间采集 0~20 cm 深土壤, 利用四分法将重复土样充分混匀作为一个非根际土壤样品。

1.4 土壤氨氧化古菌群落多样性分析

1.4.1 DNA 提取与纯化

采用改进的化学裂解法^[6]直接从土壤样品中提取 DNA。称取 5 g 土壤于 13.5 mL 缓冲液和 50 μL 蛋白酶 K(10 mg·L⁻¹)中, 37 °C 下, 225 r·min⁻¹ 振荡 30 min, 加入 1.5 mL 20% 的 SDS, 65 °C 水浴加热 2 h, 每隔 15~20 min 轻轻摇晃 1 次, 2 000~3 000 r·min⁻¹ 离心 5 min 后收集上清液, 加入 1:1 的氯仿, 充分振荡, 9 000 r·min⁻¹ 离心 5 min, 收集上清液, 并在上清液中加入 1:1 的预冷的无水乙醇过夜沉淀 DNA, 9 000 r·min⁻¹ 离心 5 min, 弃上清液, 用去离子水溶解沉淀即为 DNA 粗提液。

采用 Promega 公司的 Wizard DNA Clean-up System 试剂盒(型号为 A7280), 按操作说明对 DNA 粗提液进行纯化。

1.4.2 PCR 扩增

纯化后的 DNA 使用氨氧化古菌通用引物^[7], 扩增产物片段长度为 256 bp。

Arch-*amoA*-for GC, (5'CGC CCG CCG GGC GGG CGG GGC GGG GGC ACG GGG CTG AYT GGG CYT GGA CAT C 3')

Arch-*amoA*-rev, (5'TTC TTC TTT GTT GCC CAG TA 3')

反应体系: 20 pmol 每种引物, 1 U 的 Taq DNA polymerase, 5 μL 的 10×buffer (free MgCl₂), 1.5 mmol·L⁻¹ 的 MgCl₂, 200 μmol·L⁻¹ dNTP(每种 10 mmol·L⁻¹),

100 ng 的模板 DNA, 终体积 50 μ L。充分混匀, 短暂离心, 使附着在管壁上的样品聚集在一起。反应条件: 94 $^{\circ}$ C, 5 min; 94 $^{\circ}$ C, 1 min; 53 $^{\circ}$ C, 1 min; 72 $^{\circ}$ C, 1 min; 72 $^{\circ}$ C, 10 min; 30 个循环。

1.4.3 DGGE 分析

丙烯酰胺凝胶强度为 8%, 变性剂梯度为 30%~55%, 凝胶板制作好后, 静置 12 h 使其更好的凝固, 然后组装放入含有 1 $\times$ TAE 的电泳槽中, 预热到 60 $^{\circ}$ C, 将混合好的 20 μ L PCR 产物和 5 μ L 6 $\times$ loading buffer 用微量进样器加入胶孔, 150 V、60 $^{\circ}$ C 条件下电泳 5.5 h (Bio-Rad laboratories, Hercules, CA, USA)。电泳结束后, 待温度降至室温, 小心取出凝胶, 利用银染法进行染色, 清洗后在数码凝胶成像仪下进行观察与拍照。

1.4.4 DGGE 条带的回收与测序

由 Tanon Gis 凝胶成像图像处理系统对 DGGE 图谱中条带的迁移位置进行数字化处理, 拍照保存后取出胶片, 在不同位置切取 15 条条带, 其中 10 条为差异性条带, 其他 5 条为共有条带。按照 Saman BOWATTE 等的方法^[8]回收 DGGE 带, 由博仕生物技术有限责任公司纯化克隆条带并测定其序列, 将所得 DNA 序列与 NCBI 网站 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 数据库中已有的序列进行比对并且登录 GenBank 获取测定序列的具体信息。

1.5 数据分析

采用 Tanon Gis 数码成像系统对 DGGE 图谱中条带的位置和亮度进行数字化处理; 用 Excel2003 对生成数据进行初步处理; SPSS15.0 软件进行方差分析; 利用 LSD 法进行单因素显著性分析。氨氧化古菌群落多样性和均匀度采用 *Dsh* 和 *Jsh* 表示, 其公式为:

$$Dsh = -\sum P_i \ln P_i = (N_i / N) \ln (N_i / N)$$

$$Jsh = Dsh / \ln S$$

式中: *Dsh* 的计算是基于 DGGE 胶条带的位置和条带的强度, 而条带的强度则通过条带的峰面积来表示, 其中 *N_i* 为每个峰的峰面积, *N* 为所有峰的总面积, *S* 为条带数。

采用 NTYSY 聚类分析软件对不同样品进行聚类分析; 将测得序列与检索对应序列一起用 Clustal X 软件对其处理, 然后应用 MEGA 4.0 软件建立进化树。

2 结果与分析

2.1 土壤微生物总 DNA 的提取

由图 1 可见, 本研究所提取的土壤总质量较好, 其长度均匀, 约 23 kb, 且得到量较多, 可用于 PCR 扩增。

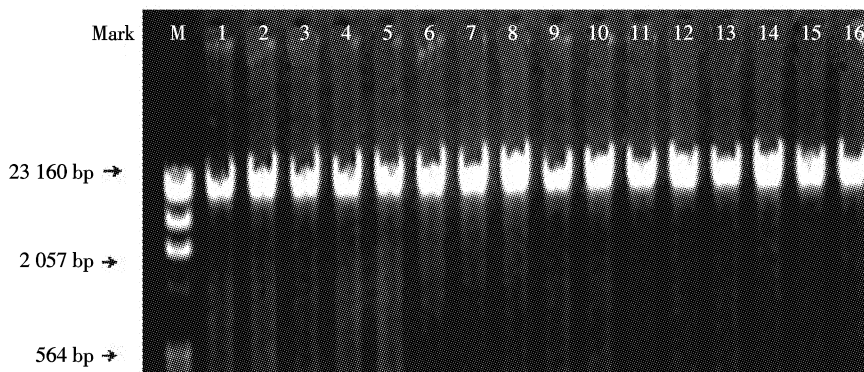
2.2 氨氧化古菌 *amoA* 基因的 PCR 扩增

将粗提后的 DNA 用试剂盒纯化后稀释 100 倍, 进行 PCR 扩增, 获得长度约 256 bp 的扩增产物片段 (图 2)。

2.3 氨氧化古菌 *amoA* 基因扩增产物的 DGGE 图谱分析

2.3.1 DGGE 图谱分析

从氨氧化古菌 *amoA* 基因扩增产物 DGGE 指纹图谱分析可以看出 (图 3), 在相同采样时间内无论是 SRTS、SRTS-S、K-W 还是 Y-S, 不同处理间有很高的相似性, 许多条带为共有条带, 这说明这些条带所代表的氨氧化古菌群落很稳定, 不受大豆品种的影响。但是与其他 3 种普通大豆相比, 在 SRTS 泳道的某些部位出现了肉眼可见的明显的优势条带 (如条带 13、14), 弱势条带 (如条带 11) 和特有条带 (条带 15、12)。另外, 值得注意的是条带 13 和条带 14 是 SRTS 处理与其受体亲本的共有优势条带, 而条带 11 则为 SRTS



1、2 SRTS; 3、4 K-W; 5、6 SRTS-S; 7、8 Y-S; 9、10 SRTS*; 11、12 K-W*; 13、14 SRTS-S*; 15、16 Y-S* (标 * 为根际土壤处理)

图 1 土壤微生物总 DNA 电泳图

Figure 1 Agarose gel electrophoresis of soil microbial total DNA

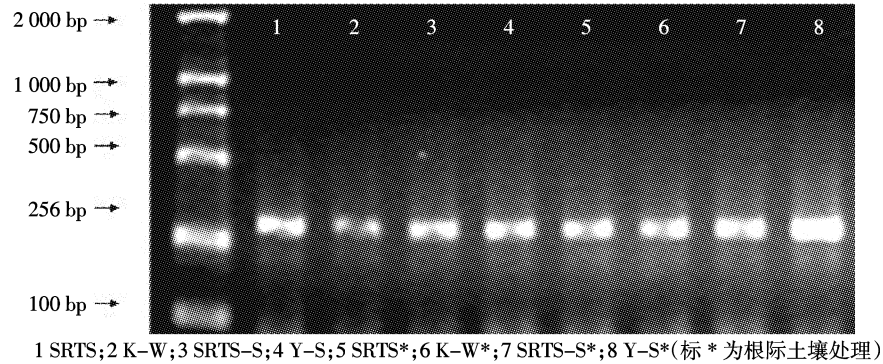
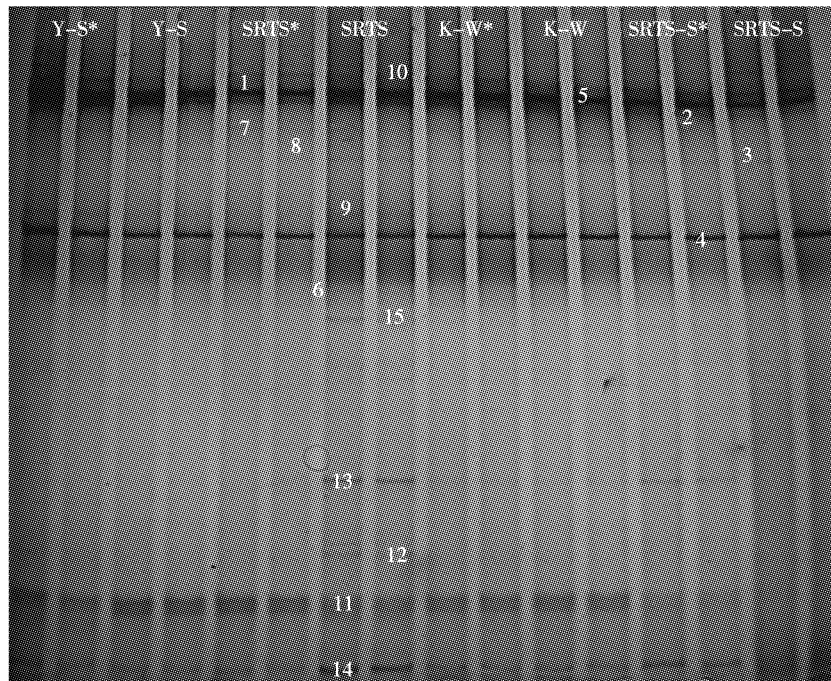
图 2 大豆土壤样品的 AOA *amoA* 基因 PCR 扩增图谱Figure 2 The electrophoresis map of AOA *amoA* gene PCR of different soybeans

图 3 不同处理根际(标*)与非根际土壤中氨氧化古菌的 PCR-DGGE 指纹图谱(标记条带被切取测序)

Figure 3 DGGE fingerprinting of AOA in rhizosphere soil(superscript *) and non-rhizosphere soil by different treatment(Labeled DGGE bands were chosen for sequencing)

与 K-W 和 Y-S 共有优势带同时为 SRTS-S 的弱势带。这可能与 SRTS 对根际与非根际土壤氨氧化古菌多样性的影响有关,也可能是在盐碱土土壤环境里相关的氨氧化古菌群落里单体氨氧化古菌数量过少,致使 DGGE 图谱上相应的条带难以辨识颜色过浅。

2.3.2 群落多样性分析

表 1 结果显示,在非根际土壤中,SRTS 处理的氨氧化古菌 DGGE 条带数、多样性指数显著高于其受体亲本 SRTS-S 和其他两种大豆处理,而均匀度指数明显低于其受体亲本;在根际土壤中,SRTS 处理的氨氧化古菌 DGGE 条带数和多样性指数亦高于处理

SRTS-S 但并不显著,而均匀度指数显著高于 SRTS-S、K-W 和 Y-S;处理 SRTS-S、K-W 和 Y-S 的根际土壤氨氧化古菌 DGGE 条带数、多样性指数显著高于非根际,而处理 SRTS 反之,其根际氨氧化古菌 DGGE 条带数、多样性指数显著低于根际。

2.3.3 不同处理的聚类分析

对 4 种大豆根际与非根际氨氧化古菌的 PCR-DGGE 图谱进行聚类分析如图 4,可以看出不同簇之间分散明显,距离很大。Y-S 的根际与非根际和 SRTS-S 的根际与非根际处理自成一簇,而 SRTS 和 K-W 自身根际与非根际处理并不成簇且距离较远。

表 1 不同处理土壤氨氧化古菌的 DGGE 图谱条带数、多样性指数和均匀度指数

Table 1 The number of DGGE bands, diversity index (*Dsh*) and homogeneous degrees index (*Jsh*) of AOA influenced by different treatments

大豆 Soybean	处理 Treatment	条带数 Band Number	多样性指数 <i>Dsh</i>	均匀度指数 <i>Jsh</i>
SRTS-S	非根际	17d	2.68±0.06d	0.97±0.01a
	根 际	19dc	2.80±0.02c	0.91±0.01c
K-W	非根际	13e	2.42±0.03f	0.94±0.02b
	根 际	17d	2.59±0.02e	0.91±0.01c
SRTS	非根际	25a	3.09±0.01a	0.96±0.03ab
	根 际	20c	2.92±0.05b	0.97±0.02a
Y-S	非根际	22b	3.02±0.01a	0.98±0.03a
	根 际	25a	3.09±0.01a	0.96±0.05ab

注:数据为平均数±标准误差;不同字母表示 5%差异显著水平。

Note: Data in the table are Mean±SE; Different letters represent the significant difference at $P<0.05$.

值得注意的是, SRTS 与其亲本受体 SRTS-S 亦不成一簇且遗传距离很远。

2.3.4 DGGE-cloning 测序分析

依据根际与非根际土壤氨氧化古菌 DGGE 图谱条带位置和亮度的数字化结果,从图谱上选择性切 15 个条带,为方便后续的建树和分析,对测序的条带重新编号:条带 1 至条带 5 为 4 种大豆处理的共有条带,条带 6 为 SRTS 特有带,条带 7 为 SRTS 缺失带,条带 8 为 SRTS 根际缺失带,条带 9 和 10 为其他大豆根土壤氨氧化古菌优势带并为 SRTS 弱势带,条带 11 是 SRTS 与 SRTS-S 共有弱势条带,剩余 4 条带为 SRTS 优势带,特别是条带 13 和条带 14,是 SRTS 与其母本受体 SRTS-S 的共有优势条带。具体每条带的近源菌见表 2。其中条带 11 的序列与 GenBank 中最匹配菌株或克隆同一性高达 100%。

2.3.5 系统发育树分析

将切胶回收的 15 个条带扩增测序,得出序列与 GenBank 中匹配的氨氧化古菌 *amoA* 基因 DNA 序列,再一起使用 MEGA4.0 软件以邻接法建立系统树发育树(图 5)。观察全图可以看出,实测与比对得出序列的进化关系呈现两个大的基因簇, DNA 序列的相似性很低,仅仅 15%,并且处于中间的各序列小分支之间相似性也很低,大部分相似性低于 60%,即遗传距离大于 0.4。但大部分测出序列与相匹配的序列呈现很高的相似性,成为独立的小簇,相似性为 80%~100%不等,特别是条带 4 和条带 2 与其相匹配的氨氧化古菌序列相似性达 100%。GenBank 中有匹配的 15 个序列均被鉴定为未知的或不可培养的氨氧化古菌(uncultured AOA)或不可培养的中温泉古菌(Un-cultured *crenarchaeote*),其中除了大部分确定为氨氧化古菌外,其他的均为氨氧化古菌分子标记基因——氨单加氧酶基因(*amoA*)的 DNA 克隆片段。

3 讨论

自转基因作物面世以来,其产品的安全性以及转基因作物对生态系统中其他生物的影响便成为了国内外学者一直关注的热点,其中争议较大的问题之一就是转基因作物的种植对根际土壤微生物群落结构和功能的影响。Andreote 等研究发现,转基因烟草可以改变土壤微生物的群落,但经过一个种植周期后土壤的微生物群落可以恢复其原有的状态^[9]。还有研究发现物转基因玉米并不会影响土壤生态系统中微生物多样性^[10],在 2 a 的转基因水稻种植过程中也并未发现其对土壤中微生物多样性产生影响^[11]。本研究的聚类分析结果表明 SRTS 与 K-W 和 Y-S 的差异距离很大,并且与其受体亲本 SRTS-S 距离也很远。同时

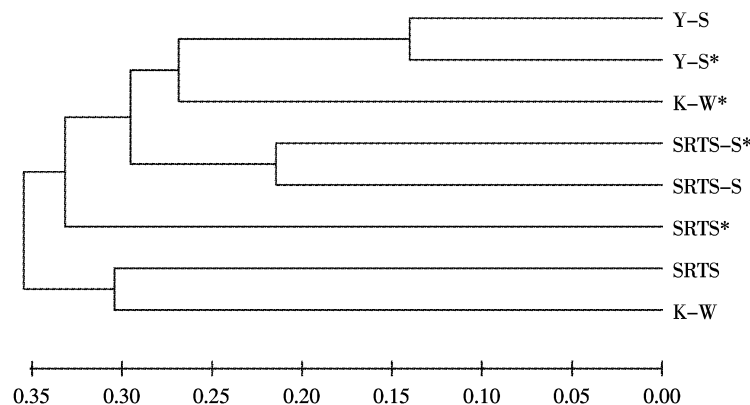


图 4 不同处理根际(标*)与非根际土壤氨氧化古菌 DGGE 图谱聚类分析

Figure 4 Cluster analysis of different treatments of AOA in rhizosphere soil (superscript *) and non-rhizosphere soil

表 2 DGGE 带的确认及根据测序结果推测的 DGGE 带代表的氨氧化古菌

Table 2 Identification of DGGE bands and deduced AOA that DGGE band represented based on DNA sequencing

序号 Sequence designation	GenBank 中最匹配菌株或克隆 Closest match Strain or clone from GenBank	相似性 Identity	Genbank 登录号 Genbank accession no.	测序 DNA 获得的登录号 Sequencing DNA Genbank accession no.
1	Uncultured <i>crenarchaeote</i> clone GS WuWeiaoa-14	98%	FN691247.1 GI:293324345	JF416033
2	Uncultured <i>crenarchaeote</i> ammonia-oxidizing clone AOA_M4_9	97%	FJ853275.1 GI:256575873	JF416032
3	Uncultured <i>crenarchaeote</i> clone ST3TS4	97%	EF534395.1 GI:155965293	JF416061
4	Uncultured <i>crenarchaeote</i> clone re55	97%	EU123496.1 GI:157168679	JF416050
5	Uncultured <i>crenarchaeote</i> clone GS WuWeiaoa-37	98%	FN691260.1 GI:293324371	JF416036
6	Uncultured <i>archaeon</i> clone ES- Core-SM2-sD01	96%	HM363897.1 GI:312435467	JF416034
7	Uncultured <i>crenarchaeote</i> clone A53 ammonia monooxygenase(<i>amoA</i>)	98%	FJ536739.1 GI:221149168	JF416040
8	Uncultured <i>crenarchaeote</i> ammonia-oxidizing clone AOA_M1_3	98%	FJ853248.1 GI:256575819	JF416054
9	Uncultured ammonia-oxidizing <i>archaeon</i> clone SGX-499	96%	EU590552.1 GI:193499078	JF416037
10	Uncultured ammonia- oxidizing <i>archaeon</i> clone:FS_G37505	97%	AB529723.1 GI:262036950	JF416038
11	Uncultured ammonia- oxidizing <i>crenarchaeote</i> clone AOA_M3_4	100%	FJ853267.1 GI:256575857	JF416041
12	Uncultured <i>crenarchaeote amoA</i> gene for clone GSWuWei aoa-36	98%	FN691259.1 GI:293324369	JF416047
13	Uncultured <i>archaeon</i> clone ES-Core- SR1-sD04	97%	HM363927.1 GI:312435527	JF416060
14	Uncultured <i>crenarchaeote</i> clone N2_10 (<i>amoA</i>)gene	98%	HM803692.1 GI:311990571	JF416042
15	Uncultured <i>crenarchaeote</i> isolate DGGE gel band 8 <i>amoA</i> gene	98%	EF990682.1 GI:157955911	JF416048

其根际与非根际处理分处两簇,相似性值较低,也间接地说明了转基因大豆对土壤微生物的群落结构和多样性有比普通大豆有更为显著的影响。这与人研究的结果一致^[12-15]。

赖欣等利用 PCR-DGGE 的研究方法得出,相对于种植的时期不同,对根际土壤固氮细菌的影响,种植转基因大豆、亲本非转基因大豆和普通大豆之间的差异并不明显^[16]。赵光研究了抗草甘膦转基因大豆对土壤脲酶、过氧化氢酶的影响,指出与正常栽培大豆相比转基因大豆根际土壤过氧化氢酶与脲酶活性受到不同程度的抑制^[17]。吕晓波得出抗草甘膦转基因大豆根际土壤细菌多样性指数与均匀度指数均低于亲本受体^[18]。Li 和 Wang 利用传统培养方法证明抗草甘膦转基因大豆抑制了根际土壤细菌数量^[19]。本研究每种大豆根际与非根际相比较得出的结果是,SRTS-S、K-W 和 Y-S 3 种非转基因大豆根际土壤氨氧化古菌的群落多样性及多样性指数均显著高于非根际土壤,

说明这 3 种大豆根系分泌物对氨氧化古菌群落多样性具有一定的促进作用,但 SRTS 的相应测得结果反之,其根际土壤中氨氧化古菌的群落数和多样性指数显著低于非根际,这表明对于 SRTS 非根际与根际环境而言,其根系分泌物对根际环境微生物的多样性可能存在抑制作用。就这一点来说,本研究结果与大多数类似研究结果一致。

密苏里州州立大学的研究人员经过 4 a 的追踪研究发现,使用抗草甘膦转基因大豆耕作系统的农田微生物组成发生了很大的变化,真菌在大豆根部及周围土壤大量繁殖^[20]。刘佳研究结果显示,抗草甘膦转基因大豆显著降低了根际土壤细菌和放线菌的数量,但提高了根际土壤真菌的数量^[21]。Kremer 研究了抗草甘膦转基因大豆与传统大豆根系分泌物成分的区别,表明前者根系分泌物中有更高量的氨基酸和碳水化合物,进而对根际微生物有一定影响^[22]。本文多样性分析得出的结果是,SRTS 根际土壤与非根际土壤的

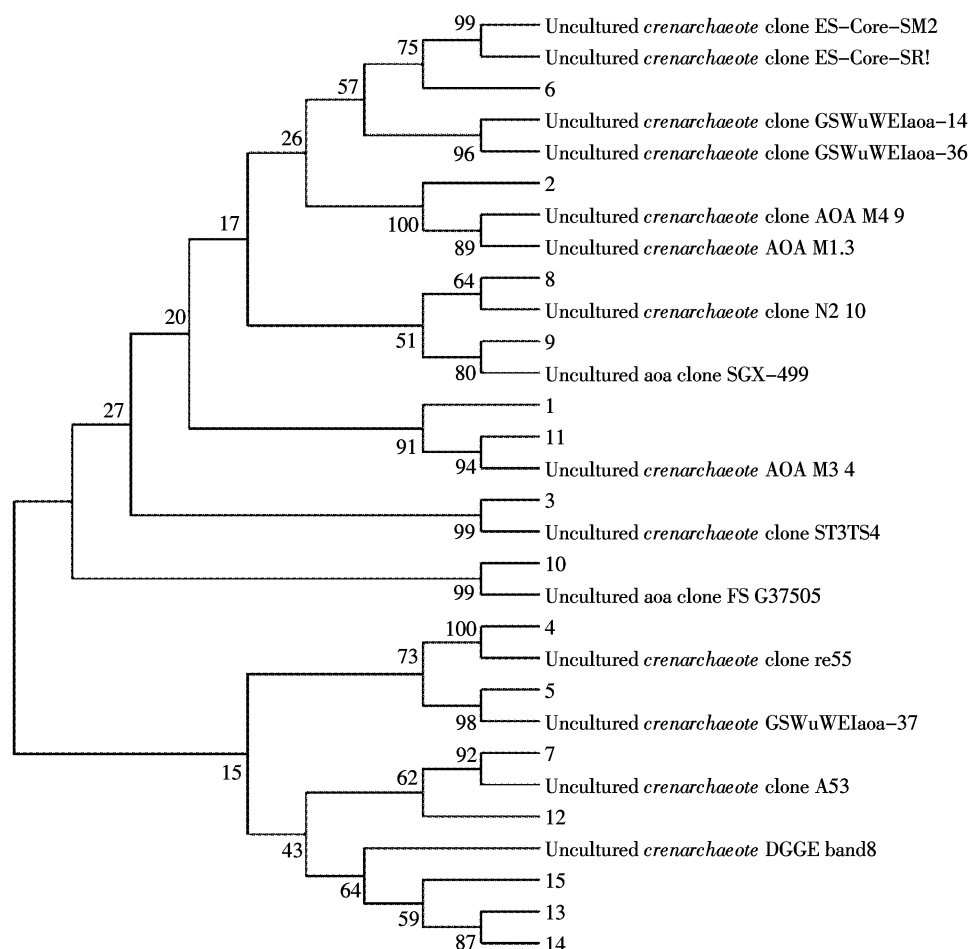


图5 基于部分 *amoA* 基因序列采用 Neighbor-joining 法构建的发育树

Figure 5 Neighbor-joining phylogenetic tree based on partial *ammonia monooxygenase A* sequences

氨氧化古菌 DGGE 图谱条带数和多样性指数均高于其受体亲本 SRTS-S, 尤其在非根际土壤中, SRTS 显著高于 SRTS-S 以及 K-W 和 Y-S。这表明 SRTS 提高了根际土壤氨氧化古菌的群落多样性, 但由于现今对 SRTS 盐碱土土壤根际与非根际微生物多样性的类似研究极少, 本文还没有找到供参考的数据和结论。综合分析可能是在盐碱土土壤生态系统中盐碱含量过高, 土壤微生物的生长和繁殖, 群落的分布和多样性等与黑土土壤环境相比会受到限制, 同时 SRTS-S、K-W 和 Y-S 在盐碱土壤中因不能充分生长, 依赖作物根际环境的微生物也可能受到消极的影响。相反, SRTS 因其具有抗盐碱土壤环境的能力, 根际土壤环境相对较好, 可能促进微生物的生长繁殖。本文得出与大多抗草甘膦转基因大豆相反的结论, 可能是因为 SRTS 和传统大豆根系分泌物成分的不同, 具体的影响机制还有待于进一步研究。

DGGE-cloning 测序结果表明, 从 DGGE 图谱切

取的条带测序序列均属于不可培养的中温泉古菌, 其中部分已鉴定为氨氧化古菌, 其余为氨氧化古菌分子标记基因——氨单加氧酶基因的克隆序列。15 条测序条带中条带 13、14 为 SRTS 与其受体亲本的共有优势条带, 而条带 15 则是二者的共有弱势条带, 这说明 SRTS 与其亲本受体 SRTS-S 在对根际与非根际土壤氨氧化古菌群落多样性的影响上保持着一定的一致性。SRTS 的特有、弱势和强势条带的存在, 说明其非根际与根际土壤中存在特有、弱势和强势的氨氧化古菌群落, 即抗盐碱转基因大豆改变了根际与非根际土壤中氨氧化古菌的群落结构及多样性。

4 结论

在非根际土壤环境中, SRTS 的 AOA DGGE 图谱条带数与多样性指数显著高于受体亲本 SRTS-S 与 K-W 和 Y-S, 可以明确 SRTS 提高了非根际土壤中 AOA 的群落多样性。

在根际土壤环境中,相同指标测得结果是Y-S>SRTS>SRTS-S>K-W,SRTS虽高于SRTS-S但并不显著,这表明SRTS的根系分泌物只是微弱地改变了根际土壤中AOA群落多样性。

SRTS的非根际处理AOA群落多样性指数显著高于其根际处理,而SRTS-S、K-W和Y-S反之,结合以上结论可以得出,SRTS对根际与非根际土壤中AOA群落多样性的促进作用并不相同,与根际处理相比,SRTS-S、K-W和Y-S的根系分泌物提高了根际AOA的群落多样性,而SRTS的根系分泌物对其则有一定的抑制作用。

参考文献:

- [1] Fang Min, Robert J Kremer, Peter P Motavalli, et al. Bacterial diversity in rhizospheres of non-transgenic and transgenic corn[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(7):4132-4136.
- [2] 徐广惠,王宏燕,刘佳.抗草甘膦转基因大豆(RRS)对根际土壤细菌数量与多样性的影响[J]. *生态学报*, 2009(8):4536-4540.
XU Guang-hui, WANG Hong-yan, LIU Jia. Effects of RRS on the amount and diversity of bacteria in rhizospheric soil[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2009(8):4536-4540.
- [3] Leininger S, Ulrich T, Schlöter M, et al. Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils[J]. *Nature*, 2006, 442(7104):80-809.
- [4] Mincer T J, Church M J, Taylor L T, et al. Quantitative distribution of presumptive archaeal and bacterial nitrifiers in Monterey Bay and the North Pacific Subtropical Gyre[J]. *Environ Microbiol*, 2007, 9(5):1162-1175.
- [5] 尧水红,刘艳青,王庆海,等.河滨缓冲带植物非根际和根际微生物特征及其对农业面源污染物去除效果[J]. *中国生态农业学报*, 2010, 18(2):365-370.
YAO Shui-hong, LIU Yan-qing, WANG Qing-hai, et al. Characteristics of aquatic plant roots, soil microbes and agricultural non-point source pollutant mitigation in riparian buffer zones[J]. *Chinese Journal of Eco-Agriculture*, 2010, 18(2):365-370.
- [6] Zhou J, Mary B, James M T. DNA recovery from soils of diverse composition[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62:316-322.
- [7] Wuchter C, Abbas B, Marco J L, et al. Archaeal nitrification in the ocean[J]. *PNAS*, 2006, 103(33):12317-12322.
- [8] Saman BOWATTE, Rie ISHIHARA, Susumu ASAKAWA, et al. Characterization of ammonia oxidizing bacteria associated with weeds in a Japanese paddy field using *amoA* gene fragments[J]. *Soil Science and Plant Nutrition*, 2006, 52:593-600.
- [9] Kozdroj Andreote F D, Mendes R, et al. Transgenic tobacco revealing altered bacterial diversity in the rhizosphere during early plant development[J]. *Antoine van Leeuwenhoek*, 2008, 93:415-424.
- [10] Saxena D, Stotzky G. *Bacillus thuringiensis* (Bt) toxin released from root exudates and biomass of Bt corn has no apparent effect on earthworms, nematodes, protozoa, bacteria, and fungi in soil[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2001, 33:1225-1230.
- [11] Liu W, Hao L H, Wu W, et al. Transgenic Bt rice does not affect enzyme activities and microbial composition in the rhizosphere during crop development[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2008, 40:475-486.
- [12] Dunfield, Germida, Dunfield K E, et al. Impact of genetically modified crops on soil and plant associated microbial communities[J]. *Journal of Environmental Quality*, 2004, 33:806-815.
- [13] M. Douville. Occurrence and persistence of *Bacillus thuringiensis* (Bt) and transgenic Bt corn cry1Ab gene from an aquatic environment[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2007, 66:195-203.
- [14] J deVries, T Herzfeld, W Wackernagel. Transfer of plastid DNA from tobacco to the soil bacterium *Acinetobacter* sp. by natural transformation[J]. *Molecular Microbiology*, 2004, 53:323-334.
- [15] 张丽莉,武志杰,陈利军,等.转基因棉种植对土壤水解酶活性的影响[J]. *生态学报*, 2006, 25(11):1348-1351.
ZHANG Li-li, WU Zhi-jie, CHEN Li-jun, et al. Effects of transgenic cotton planting on soil hydrolase activity[J]. *Chinese Journal of Ecology*, 2006, 25(11):1348-1351.
- [16] 赖欣,张永生,赵帅,等.转基因大豆对根际固氮细菌群落多样性的影响[J]. *生态学报*, 2010, 29(9):1736-1742.
LAI Xin, ZHANG Yong-sheng, ZHAO Shuai, et al. Effects of transgenic soybean on the diversity of nitrogen-fixing bacteria in rhizosphere[J]. *Chinese Journal of Ecology*, 2010, 29(9):1736-1742.
- [17] 赵光,王宏燕.土壤微生物多样性的分子生态学研究方法[J]. *中国林副特产*, 2006(1):54-56.
ZHAO Guang, WANG Hong-yan. Soil micro-organism biodiversity molecule ecology research approach[J]. *Forest By-Product and Specialty in China*, 2006(1):54-56.
- [18] 吕晓波,王宏燕,刘琦,等.抗草甘膦转基因大豆(RRS)在黑土生态系统种植的安全性研究[J]. *大豆科学*, 2009, 28(2):260-265.
LV Xiao-bo, WANG Hong-yan, LIU Qi, et al. Bio-safety of roundup ready soybean (RRS) planted in black soil ecosystem[J]. *Soybean Science*, 2009, 28(2):260-265.
- [19] Li Ning, Wang Hong-yan. Effect of RRS on nitrogen transition and related bacteria in rhizosphere soil[J]. *Journal of Northeast Agricultural University (English Edition)*, 2007, 14(4):333-336.
- [20] 杨昌举,宋林,王竹.转基因大豆对生物多样性的影响[J]. *环境保护*, 2002(11):24-27.
YANG Chang-ju, SONG Lin, WANG Zhu. Influence of transgenic soybeans on biodiversity[J]. *Environmental Protection*, 2002(11):24-27.
- [21] 刘佳,刘志华,徐广惠,等.抗草甘膦转基因大豆(RRS)对根际微生物和土壤氮素转化的影响[J]. *农业环境科学学报*, 2010, 29(7):1341-1345.
LIU Jia, LIU Zhi-hua, XU Guang-hui, et al. Effects of roundup ready soybean (RRS) on micro-organisms and nitrogen transformation in the rhizospheric soil[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2010, 29(7):1341-1345.
- [22] Kremer R J, Means N E. Glyphosate affects soybean root exudation and rhizosphere micro-organisms[J]. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 2005, 85(15):1165-1174.