

不同耐草甘膦转基因大豆对根际土壤固氮细菌多样性的影响

章秋艳^{1,2}, 赵建宁¹, 李刚¹, 王丽娟^{1,3}, 王慧¹, 常泓², 杨殿林^{1*}

(1. 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实验室, 天津 300191; 2. 山西农业大学生命科学学院, 山西 太谷 030801; 3. 内蒙古师范大学生命科学与技术学院, 呼和浩特 010022)

摘要: 采用盆栽试验结合 DGGE-cloning 测序技术比较分析了耐草甘膦转基因大豆 M88、GTS40-3-2、ZB 及常规非转基因大豆中黄 13 在成熟期对根际土壤固氮细菌多样性的影响。结果表明, 耐草甘膦转基因大豆 M88、GTS40-3-2 和非转基因大豆中黄 13 根际土壤固氮细菌多样性指数和均匀度指数无显著差异; 抗虫耐草甘膦转基因大豆 ZB 根际土壤固氮细菌多样性指数显著高于非转基因大豆中黄 13, 均匀度指数无显著差异。克隆测序结果表明, 4 种大豆根际土壤固氮细菌主要隶属于 α -变形菌纲、 β -变形菌纲、 γ -变形菌纲、蓝藻纲和一些未知细菌类。相对于不同大豆品种对固氮细菌多样性的影响, 耐草甘膦 *CP4 epsps* 基因的导入并没有对根际土壤固氮细菌多样性产生显著影响。

关键词: 转基因大豆; 根际土壤; 固氮细菌; 多样性; *nifH*; DGGE-cloning

中图分类号: X172 文献标志码: A 文章编号: 1672-2043(2013)09-1827-07 doi:10.11654/jaes.2013.09.018

Effects of Different Glyphosate-tolerance Soybeans on the Diversity of Nitrogen-fixing Bacteria in Rhizosphere Soil

ZHANG Qiu-yan^{1,2}, ZHAO Jian-ning¹, LI Gang¹, WANG Li-juan^{1,3}, WANG Hui¹, CHANG Hong², YANG Dian-lin^{1*}

(1. Agro-Environmental Protection Institute, Ministry of Agriculture, Open Fund of Key Laboratory of Original Agro-environment Quality of Ministry of Agriculture and Tianjin Key Laboratory of Agro-environment and Agro-product Safety, Tianjin 300191, China; 2. College of Life Science, Shanxi Agricultural University, Taigu Shanxi 030801, China; 3. College of Life Science and Technology, Inner Mongolia Normal University, Hohhot 010022, China)

Abstract: Transgenic crops are grown on an increasingly large scale around the world, and accompanied by public concern about their potential ecological and environmental impacts. The persistence and interaction of proteins derived from transgenic crops in soil and their effects on soil microbial are essential information when investigating their effects within the soil ecosystem. The nitrogen-fixing bacterial diversity in the rhizosphere of glyphosate-tolerance transgenic soybean M88, GTS40-3-2, ZB and conventional non-transgenic soybean zhonghuang13 was analyzed under pot experiments by DGGE-cloning technique. Soil samples were collected in November 2011 at mature stage. The results showed that the diversity index and evenness index of soil nitrogen-fixing bacteria of transgenic soybean M88(*CP4 epsps*) and GTS40-3-2(*CP4 epsps*) were not significantly different from non-transgenic soybean zhonghuang13. The diversity index of soil nitrogen-fixing bacteria of transgenic soybean ZB(*Bt cryIAb+CP4 epsps*) was significantly higher than local major soybean zhonghuang13, while the evenness index showed no significant difference. The results of cloning and sequencing results showed that the soil nitrogen-fixing bacteria in the rhizosphere of the four soybean cultivars mainly belonged to α -proteobacteria, β -proteobacteria, γ -proteobacteria, cyanobacteria and unknown. These results suggested that compared with soybean varieties, the transformation of the *CP4 epsps* gene into soybean didn't cause significant effect on the nitrogen-fixing bacterial diversity in soybean rhizosphere.

Keywords: transgenic soybean; rhizosphere soil; nitrogen-fixing bacteria; diversity; *nifH*; DGGE-cloning

收稿日期: 2013-02-22

基金项目: 转基因生物新品种培育重大专项(2011ZX08012-005); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(农业部环境保护科研监测所)

项目: 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实验室开放基金

作者简介: 章秋艳(1989—), 女, 山西运城人, 硕士研究生, 主要从事转基因植物生态环境安全研究。E-mail: zhangqiuyan147@163.com

* 通信作者: 杨殿林 E-mail: yangdianlin@caas.cn

根据国际农业生物技术应用服务组织(ISAAA)的最新报道,2012年全球转基因作物种植面积达1.703亿 hm^2 ,较2011年的1.6亿 hm^2 增长了6%。在转基因作物商业化种植的17年间,转基因作物种植面积由170万 hm^2 增长至1.7亿 hm^2 ,增长了100倍,这是前所未有的突破^[1]。转基因大豆作为主要种植的转基因作物,2011年种植面积达到7540万 hm^2 ,占全球转基因作物种植面积的47%,耐草甘膦大豆是种植最为广泛的转基因大豆^[2]。然而大豆除受杂草危害外,也受到食心虫、胞囊线虫、蚜虫等多种害虫的影响,每年虫害导致的损失占大豆总产量的20%~30%^[3],利用基因工程手段培育抗虫大豆新品种取得了一定的进展^[4]。值得关注的是转基因复合性状作物已经成为一个非常重要的发展趋势,2012年复合性状转基因作物的种植面积是4370万 hm^2 ,占全球转基因作物种植面积的26%,其中抗虫耐除草剂作物是增长最快的复合性状作物^[1]。在关注转基因大豆所带来的社会经济和环境效益的同时,其环境安全性问题也引起了人们的重视。

固氮细菌在土壤氮素循环中发挥着不可替代的作用,在土壤生态系统中,大豆与固氮细菌形成共生固氮可为农作物提供所需的氮素营养。固氮细菌数量和种群结构的变化直接影响土壤固氮效率的高低和土壤氮素循环的正常运转^[5]。*nifH*基因是所有固氮微生物含有的最保守的功能基因^[6],它的保守性与16S rRNA基因相似,因此可以用来研究细菌分子多样性。与此同时,*nifH*基因作为功能基因还可以表现生态系统中具有固氮功能的细菌多样性的变化,进而反映生态环境中固氮功能的变化。目前已有不少研究者通过*nifH*基因的多样性来探讨不同生境固氮微生物群落结构和多样性的变化^[7]。转基因大豆大面积种植后,外源基因及其表达产物可通过根系分泌物、花粉、植株残体进入土壤生态系统,很可能对固氮细菌的种类、数量以及多样性产生影响^[8]。

近年来国内外对耐草甘膦大豆的生态安全性进行了多方面的研究,包括对土壤微生物^[9-10]、非靶标节肢动物群落结构^[11]的影响和基因漂移^[12]及基因降解^[13]情况等,而同一时期不同耐草甘膦大豆对土壤微生物多样性的影响报道较少,因此研究不同耐草甘膦大豆种植对土壤固氮细菌多样性的影响具有重要的生态学意义。本研究采用PCR-DGGE与克隆测序相结合的方法,以耐草甘膦大豆M88、GTS40-3-2和抗虫耐草甘膦复合性状大豆ZB为材料,研究不同耐草甘膦

大豆品种在成熟期对根际土壤固氮细菌多样性的影响,目的在于探讨根际土壤固氮细菌对耐草甘膦转基因大豆品种响应的差异,为耐草甘膦转基因大豆生物安全性评价提供理论依据和技术支撑。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试土壤取自中国农业科学院武清转基因生物农田生态系统影响野外科学观测试验站,试验前常年种植普通小麦和玉米。质地为潮土,有机质含量为 $10.69\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$,全氮 $0.63\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$,全磷 $1.35\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$,pH 7.3。播种前过2 mm筛并充分混匀。

供试大豆品种为耐草甘膦转基因大豆M88(*CP4 epsps*)、GTS40-3-2(*CP4 epsps*),抗虫耐草甘膦转基因大豆ZB(*Bt cry1Ab+CP4 epsps*)和常规非转基因大豆中黄13。

1.2 试验设计及样品采集

盆栽试验在农业部环境保护科研监测所(39°5' N; 117°8' E)网室中进行。气候属于温带大陆性季风气候,年平均降水量360~970 mm,年平均气温11.6~13.9℃。试验始于2011年8月,共设4个处理,分别为M88、ZB、GTS40-3-2和中黄13。供试盆中各装5.6 kg供试土壤。每种大豆分别种植20盆。每盆播5粒大豆种子,待四叶期时,留苗3株。在种植及管理过程中均不施农药,施肥量为N、P、K各 $30\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,以 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 和 KH_2PO_4 配成液体形式施入。2011年11月大豆成熟期采集根际土壤样品。各处理随机选取5盆共15株植株,采用抖落法收集根际土壤并混匀,作为1个土壤样品,共4个重复。土壤样品装入灭菌封口袋中做好标记,放于低温冰盒中带回实验室,于-20℃冰箱中保存。

1.3 研究方法

1.3.1 土壤微生物总DNA的提取

采用UltraClean™ Soil DNA Isolation Kit(Mo Bio Laboratories, Solana Beach, CA, USA)按照操作说明提取土壤总DNA。最后用50 μL Nuclease-Free Water洗脱获得土壤DNA溶液。土壤DNA经1.0%琼脂糖凝胶电泳检测样品质量。

1.3.2 PCR扩增

采用巢式PCR(nested PCR)方法扩增固氮微生物*nifH*基因序列,每个处理各3次重复。引物见表1。PCR反应体系为50 μL ,其中Premix Ex Taq(TaKaRa)25 μL ,40 ng的模板DNA,25 pmol每种引物,灭菌水

补足至 50 μL 。第 2 轮以 1 μL 第 1 轮 PCR 产物为模板,其余按照上述反应体系进行加样,最后用灭菌水补足至 50 μL 。反应条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min,55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min (第 2 轮退火温度为 48 $^{\circ}\text{C}$),72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 min,35 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min。

表 1 固氮细菌 *nifH* 基因 PCR 反应中的引物及序列

Table 1 Primers used to amplify the nitrogen-fixing bacteria *nifH* gene

	引物	引物序列	片段长度(bp)
第一轮	FGPH19	TAC GGC AAR GGT GGN ATH G	450
	PoIR	ATS GCC ATC ATY TCR CCG GA	
第二轮	AQER	GAC GAT GTA GAT YTC CTG	320
	PoIF-GC*	TGC GAY CCS AAR GCB GAC TC	

$$R=A/G; Y=C/T; S=G/C; H=T/C/A; N=A/T/C/G$$

*GC 夹子 GC clamp:CGCCCGCCGCGCCCGCGCCCGCCCGCC-
GCCCCGCCCC.

1.3.3 DGGE 分析

PCR 产物采用 Dcode™ 通用突变检测系统 (Bio-Rad, USA) 按照操作说明进行 DGGE 分析。聚丙烯酰胺凝胶 (37.5:1) 浓度为 8%, 变性剂梯度为 40%~60% (100% 变性剂含有 7 mol·L⁻¹ 尿素和 40% (V/V) 去离子甲酰胺)。200 V、60 °C 条件下电泳 6.5 h。电泳结束后, 小心取出凝胶, 放在 SYBR™ Green I (1:10 000 稀释) 染色 30 min, 然后在 Bio-rad 公司的凝胶成像系统下进行观察与拍照。

1.3.4 DGGE 条带的回收和序列测定

选取 DGGE 图谱中主要条带进行割胶回收, 用不带 GC 夹的 PolF 和 AQER 引物扩增。将确定为单一条带的 PCR 产物用纯化试剂盒(Promega)纯化后与载体 pGEMT-easy Vector(Promega)连接, 转化到大肠杆菌(*Escherichia coli*)JM109 中。阳性克隆送由生工生物工程(上海)股份有限公司完成。将测序所得 DNA 序列与 NCBI 数据库中已有序列进行 Blast 序列比对获取相近典型菌株序列。然后用 ClustalX 1.81 和 Mega 4.0 中的邻接法(neighbor-joining)建立固氮微生物 *nifH* 基因的系统发育树。

1.4 数据分析

采用 Quantity One 图像处理软件对 DGGE 图谱中的条带的位置和亮度进行数字化处理并进行聚类分析。使用 Excel 2003 和 SPSS 16.0 统计软件进行试验数据汇总、方差分析,利用 LSD 法进行单因素显著性分析。

采用 Shannon-Winner index (H') 和均匀度指数 (EH') 评价固氮细菌多样性的变化, 其计算公式如下:

$$H' = - \sum_{i=1}^S p_i \ln p_i$$

$$EH' = H' / \ln S$$

式中: S 为条带总数或丰度; p_i 为第 i 条带占总密度的比例。

2 结果与分析

2.1 DGGE 图谱分析

nifH DGGE 图谱(图 1)显示了耐草甘膦转基因大豆 M88、GTS40-3-2、抗虫耐草甘膦转基因大豆 ZB 和常规大豆中黄 13 成熟期根际土壤固氮细菌群落结构组成。根据电泳图谱中每条条带的亮度,对不同大豆品种根际土壤固氮微生物 *nifH* 基因多样性指数(H')和均匀度指数(EH')进行分析。由表 2 可知,根际土壤固氮细菌多样性指数在 2.1~2.4 之间,固氮细菌群落分布的均匀度指数在 0.65~0.74 之间。

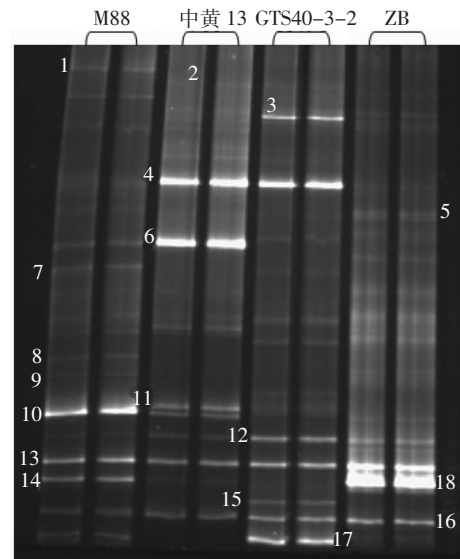
图 1 土壤固氮细菌 *nifH* 基因的 DGGE 图谱

Figure 1 DGGE profiles of soil nitrogen-fixing bacteria *nifH* gene

由表 2 可见,耐草甘膦大豆 M88、GTS40-3-2、抗虫耐草甘膦转基因大豆 ZB 与非转基因大豆中黄 13 条带数无显著差异,但不同条带亮度有差异。耐草甘膦大豆 M88 根际土壤固氮细菌多样性指数和均匀度指数均低于常规大豆中黄 13,差异不显著;耐草甘膦大豆 GTS40-3-2 根际土壤固氮细菌多样性指数和均匀度指数均高于常规大豆中黄 13,差异同样不显著;

表 2 不同处理根际土壤固氮细菌 DGGE 图谱条带数、多样性指数和均匀度指数

Table 2 Number of DGGE bands, diversity index and evenness index of nitrogen-fixing bacteria

大豆种类	条带数	多样性指数	均匀度指数
M88	25±2.000a	2.105±0.206b	0.653±0.049b
中黄 13	23±1.155a	2.110±0.113b	0.679±0.026ab
GTS40-3-2	24±1.528a	2.221±0.167ab	0.702±0.051ab
ZB	26±2.309a	2.419±0.034a	0.746±0.030a

注:表中数据为平均数±标准误差, $n=3$; 同列不同字母表示差异显著 ($P<0.05$)。

Note: Data are Mean±SE, different letters in the same column indicated significant difference at $P<0.05$.

而抗虫耐草甘膦大豆 ZB 根际土壤固氮菌多样性指数显著高于常规大豆中黄 13, 但均匀度指数差异不显著。虽然抗虫耐草甘膦大豆 ZB 和抗草甘膦大豆 GTS40-3-2 根际土壤固氮细菌多样性指数和均匀度指数无显著差异, 但显著高于抗草甘膦大豆 M88。由此可见, 相对于不同大豆品种, 外源 *CP4 epsps* 基因的插入并没有引起大豆根际土壤固氮细菌群落结构发生明显的变化。

聚类分析结果(图 2)表明, 非转基因大豆中黄 13 与抗草甘膦大豆 GTS40-3-2 相似性为 60%, 聚成一簇, 这说明中黄 13 根际土壤固氮菌种类与 GTS40-3-2 相似性最高, 非转基因大豆中黄 13 和耐草甘膦大豆 GTS40-3-2 土壤固氮菌多样性指数和均匀度指数无显著差异进一步说明了这个结果。抗虫耐草甘膦 ZB 与非转基因大豆中黄 13 和耐草甘膦大豆 GTS40-3-2 的相似性为 49%, 抗草甘膦大豆 M88 与抗虫耐草甘膦大豆 ZB、非转基因大豆中黄 13 和耐草甘膦大豆 GTS40-3-2 的相似性为 41%, 均小于 50%。

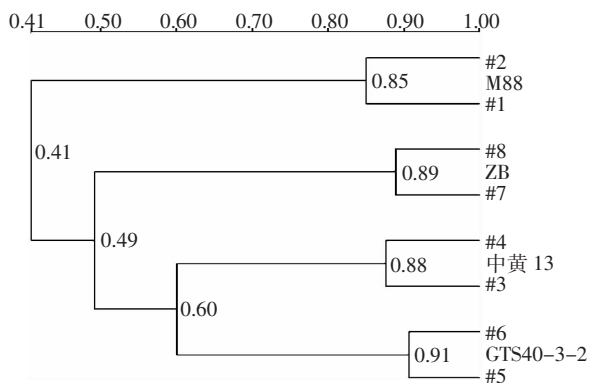


图 2 土壤固氮细菌 *nifH* 基因聚类分析

Figure 2 Cluster analysis of nitrogen-fixing bacteria in soil

2.2 土壤固氮微生物 *nifH* 基因测序结果及系统发育分析

依据根际土壤固氮细菌 DGGE 图谱条带位置和亮度的数字化结果, 从图谱上选择性切取 18 条带(图 1), 将这些条带进行切胶回收、连接、转化后测序。测序结果通过 Blast 进行比较得到其相近的菌株, 每条条带的近缘菌信息见表 3。选择特异性较强的菌株序列加入测序得到的结果, 构建系统发育树, 通过系统发育树可以直观得出不同条带所对应的固氮细菌种类(图 3)。

由图 3 可以看出, 盆栽大豆根际土壤固氮细菌主要隶属于 α -变形菌纲、 β -变形菌纲、 γ -变形菌纲、蓝藻纲, 同时还包括不可培养的细菌。耐草甘膦大豆 M88、GTS40-3-2 和抗虫耐草甘膦大豆 ZB 与非转基因大豆中黄 13 所共有的条带 6、12、13、16 中, 条带 6 隶属于蓝藻纲的鞘丝藻属; 条带 12 隶属于 γ -变形菌纲; 条带 13 隶属于 β -变形菌纲的伯克氏菌属; 条带 16 隶属于不可培养的固氮细菌。条带 7、9 和 17 隶属于 α -变形菌纲的根瘤菌属。M88 特有的条带 8 和 GTS40-3-2 特有的条带 15 均隶属于 β -变形菌纲的伯克氏菌属。非转基因大豆中黄 13 特有的条带 11 隶属于 γ -变形菌纲。抗虫耐草甘膦大豆 ZB 特有的条带 5 和条带 18 均隶属于不可培养的固氮细菌。

3 讨论

自 2000 年美国环保署 (Environmental Protection Agency, EPA) 将转基因作物对土壤生态系统的影响列为转基因作物风险评价的重要组成部分以来, 转基因作物种植对根际土壤微生物群落结构和功能的影响受到了国内外学者的普遍关注, 与之有关的报道也在不断增多^[14-15]。转基因作物大面积种植后, 其所表达的基因产物将以残体或根系分泌物的形式释放到土壤中, 与土壤中整个微生物区系相互作用, 对土壤微生物的种类、数量以及生命活动状况产生影响^[16]。目前, 国内外已有很多学者采用多种方法来研究转基因大豆对土壤微生物群落结构及多样性的影响^[17-18]。

Siciliano 研究发现耐草甘膦转基因作物明显抑制了土壤微生物的数量^[19]; 李宁等利用传统培养方法证明耐草甘膦转基因大豆抑制了根际土壤细菌的数量^[20]; 刘佳等研究发现耐草甘膦转基因大豆降低了根际土壤氨氧化细菌、硝化细菌、反硝化细菌等微生物的数量^[21]。与上述研究结果不同, 本研究于大豆成熟期采集根际土壤并进行 PCR-DGGE 分析, 发现耐草

表 3 DGGE 条带序列比对结果

Table 3 Results of a BLAST analysis on the sequences of the 18 *nifH*/DGGE sequenced bands

条带编号	相似度/%	GenBank 登录号	比对菌描述
1	92	AY972874.1	Gamma proteobacterium BAL281 <i>nifH</i> gene
2	90	FR669144.1	<i>Pseudomonas stutzeri</i> partial <i>nifH</i> gene
3	87	DQ398563.1	Uncultured cyanobacterium
4	89	EF397816.1	<i>Lyngbya wollei</i> clone
5	97	HQ335690.1	Uncultured bacterium
6	88	DQ471425.1	<i>Filamentous thermophilic cyanobacterium</i>
7	93	HQ231512.1	<i>Rhizobium</i> sp.
8	94	HM565855.1	Uncultured <i>Burkholderia</i> sp.
9	90	DQ431164.1	<i>Azorhizobium</i> sp.
10	93	HM565855.1	Uncultured <i>Burkholderia</i> sp.
11	91	AY972874.1	Gamma proteobacterium BAL281 <i>nifH</i> gene
12	92	AY972874.1	Gamma proteobacterium BAL281 <i>nifH</i> gene
13	90	AB188122.1	<i>Azohydromonas lata</i> <i>nifH</i> gene
14	94	HM565855.1	Uncultured <i>Burkholderia</i> sp.
15	88	AB188122.1	<i>Azohydromonas lata</i> <i>nifH</i> gene
16	97	HQ335690.1	Uncultured bacterium clone
17	88	GQ289565.1	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> clone
18	89	DQ098163.1	Uncultured nitrogen-fixing bacterium

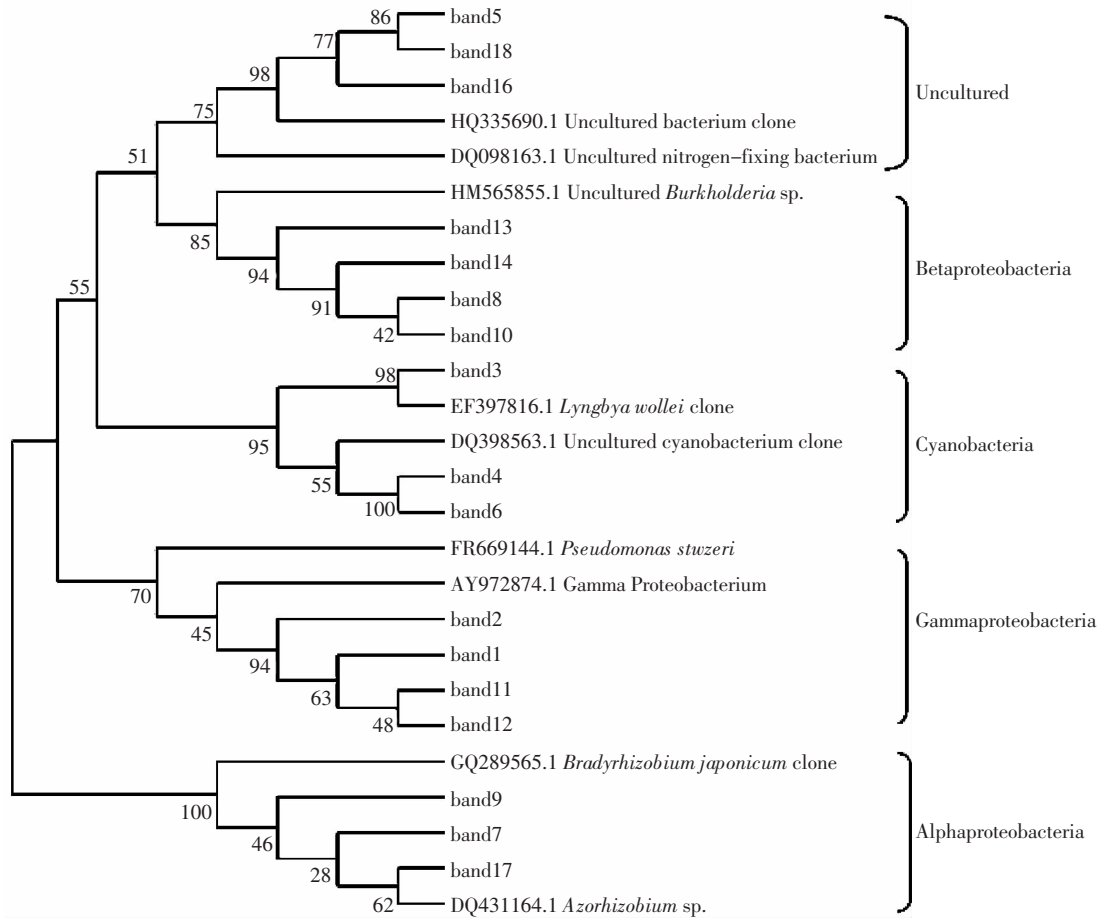


图 3 采用 Neighbor-joining 法构建的系统发育树

Figure 3 Neighbor-joining phylogenetic tree

甘磷转基因大豆 M88 和 GTS40-3-2 对根际土壤固氮细菌多样性无显著影响。此外,也有一些研究报道耐草甘磷转基因大豆对土壤微生物没有显著影响。赖欣等^[22]利用 PCR-DGGE 和克隆测序相结合的方法研究发现转基因大豆对土壤固氮细菌没有明显影响;李刚等^[23]研究表明耐草甘磷转基因大豆对土壤细菌多样性无显著影响;刘志华等^[24]研究发现耐草甘磷转基因大豆对根际土壤氨氧化古菌多样性没有显著影响。这些结果与本试验结果基本一致。Fang 等^[25]研究表明,与土壤类型、生长时期、耕作方式及品种相比,转基因作物的扰动是细微的。

本文研究发现抗虫耐草甘磷转基因大豆 ZB 根际土壤固氮细菌多样性指数显著高于非转基因大豆中黄 13 和耐草甘磷转基因大豆 M88。这种结果产生的原因可能是复合性状转基因大豆中外源 *Bt cryIAb* 和 *CP4 epsps* 基因的协同表达造成转基因植株生理生化特性的改变,进而引起根际分泌物数量或化学组成发生改变,从而改变与固氮细菌紧密接触的根际土壤微生态环境^[26]。有研究表明,转 *Bt* 基因作物根系土壤中好氧细菌和真菌的数量、固氮微生物的活性相比对照显著增强^[27-28]。抗虫耐草甘磷大豆田间释放后,转入的 *Bt* 基因有可能对土壤中固氮微生物的种类、数量及生命活动状况施加影响,具体的影响机制还有待于进一步研究。

克隆测序结果研究发现,盆栽大豆根际土壤固氮细菌主要属于 α -变形菌纲、 β -变形菌纲、 γ -变形菌纲、蓝藻纲,还包括一部分不可培养的细菌。变形菌门在土壤中广泛存在且大部分固氮细菌属于该菌门,本试验测序得到的 18 个结果中,12 个属于变形菌门,占 67%。这与赖欣等^[22]的研究结果一致。然而,其中仍存在少量较明显的差异,如 DGGE 图谱中特异条带在转基因大豆与中黄 13 之间并不一致,聚类分析得到的相似性也不高。DGGE 图谱中,常规大豆中黄 13 缺失,耐草甘磷转基因大豆 M88 和 GTS40-3-2 共有的条带 7 和 17、耐草甘磷转基因大豆 M88 独有的条带 9 经测序发现为根瘤菌属,推断耐草甘磷大豆的种植对根际土壤根瘤菌属有一定的促进作用。Kremer 研究表明耐草甘磷大豆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^[29]。也可能与土壤类型、生长时期、品种及栽培条件等因素相关^[30]。

本研究采用盆栽方法研究耐草甘磷大豆对根际土壤固氮细菌多样性的影响,Saxena 等研究发现转

Bt 基因玉米与对照相比,盆栽和大田土壤中可培养的细菌、放线菌和真菌数量和种类没有统计学上的显著差异^[31]。由于作物、转入基因和供试土壤均不同,盆栽条件仍不能够全面反映田间环境条件下不同耐草甘磷大豆对根际土壤固氮细菌多样性的影响,仍需通过田间试验进一步深入研究。

4 结论

本试验以耐草甘磷转基因大豆 M88、GTS40-3-2、抗虫耐草甘磷转基因大豆 ZB 和常规非转基因大豆中黄 13 为材料,采用 DGGE 和克隆测序技术对不同耐草甘磷大豆在成熟期时对根际土壤固氮细菌多样性的影响进行了研究。结果表明:①在大豆成熟期时,相对于不同品种之间的差异,单独导入外源耐草甘磷 *CP4 epsps* 基因未对大豆植株根际土壤固氮细菌多样性产生明显影响;②克隆测序发现盆栽大豆根际土壤固氮细菌主要隶属于变形菌门、蓝藻门和不可培养的未知菌类。

参考文献:

- [1] James Clive. 2012 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, 2013, 33(2): 1-8.
James Clive. Global status of commercialized biotech/GM Crops; 2012 [J]. *China Biotechnology*, 2013, 33(2): 1-8.
- [2] James Clive. 2011 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, 2012, 32(1): 1-14.
James Clive. Global status of commercialized biotech/GM Crops; 2011 [J]. *China Biotechnology*, 2012, 32(1): 1-14.
- [3] 武小霞, 李文滨. 大豆抗虫基因工程研究进展及发展趋势[J]. 东北农业大学学报, 2005, 36(4): 502-506.
WU Xiao-xia, LI Wen-bin. Research progress and development direction of soybean pest-resistance gene engineering[J]. *Journal of Northeast Agricultural University*, 2005, 36(4): 502-506.
- [4] 王娟, 刘森, 王志坤, 等. 大豆抗病、抗虫转基因研究进展[J]. 大豆科学, 2011, 30(5): 855-873.
WANG Juan, LIU Miao, WANG Zhi-kun, et al. Advances in transgenic soybean resistant to disease and pest[J]. *Soybean Science*, 2011, 30(5): 855-873.
- [5] 张晶, 张惠文, 苏振成, 等. 长期有机污水灌溉对土壤固氮细菌种群的影响[J]. 农业环境科学学报, 2007, 26(2): 662-666.
ZHANG Jing, ZHANG Hui-wen, SU Zhen-cheng, et al. The effect of long-term organic waste water irrigation on the soil nitrogen-fixing bacteria population[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2007, 26(2): 662-666.
- [6] 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.
- [7] 文都日乐, 李刚, 杨殿林, 等. 呼伦贝尔草原土壤固氮微生物 *nifH*

- 基因多样性与群落结构[J]. 生态学杂志, 2011, 30(4):790-797.
- WENDU Ri-le, LI Gang, YANG Dian-lin, et al. *nifH* gene diversity and community structure of soil nitrogen-fixing bacteria in Hulunbeier grassland, Inner Mongolia[J]. *Chinese Journal of Ecology*, 2011, 30(4):790-797.
- [8] Dunfield K E, Germida J J. Impact of genetically modified crops on soil- and plant-associated microbial communities[J]. *Journal of Environmental Quality*, 2004, 33(3):806-815.
- [9] Means N E, Kremer R J, Ramsier C. Effects of glyphosate and foliar amendments on activity of microorganisms in the soybean rhizosphere[J]. *Environmental Science and Health B*, 2007, 42(2):125-132.
- [10] 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, 29(8):4535-4541.
- 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, 29(8):4535-4541.
- [11] 吴奇, 彭德良, 彭于发. 抗草甘膦转基因大豆对非靶标节肢动物群落多样性的影响[J]. 生态学报, 2008, 28(6):2622-2628.
- WU Qi, PENG De-liang, PENG Yu-fa. Effects of herbicide tolerant soybean on biodiversity of non-target arthropods communities[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2008, 28(6):2622-2628.
- [12] 刘琦, 李希晨, 刘昭军, 等. 抗草甘膦转基因大豆基因漂移的研究: I 大豆风媒介传粉的基因漂移研究[J]. 黑龙江农业科学, 2008(1):14-16.
- LIU Qi, LI Xi-chen, LIU Zhao-jun, et al. Study on roundup ready soybean's roundup ready gene flowing: I study on roundup ready gene move to soybean by anemophily[J]. *Heilongjiang Agricultural Sciences*, 2008(1):14-16.
- [13] Levy-Booth D J, Gulden R H, Campbell R G, et al. Roundup ready soybean gene concentrations in field soil aggregate size classes[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2009, 291(2):175-179.
- [14] Glandorf C M, Bakker Pahm, Loon L C, et al. Influence of the production of antibacterial and antifungal proteins by transgenic plants on the saprophytic soil microflora[J]. *Acta Botanica Neerlandica*, 1997, 46(1):85-104.
- [15] Oger P, Petit A, Dessaux Y. Genetically engineered plants producing opines alter their biological environment[J]. *Nature Biotechnology*, 1997, 15(4):369-372.
- [16] Angle J S. Release of transgenic plants: Biodiversity and population level considerations[J]. *Molecular Ecology*, 1994, 3:45-50.
- [17] 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.
- [18] 桂恒, 张培培, 华小梅, 等. 富含硫氨基酸转基因大豆对根际土壤微生物群落结构的影响[J]. 中国油料作物学报, 2012, 34(2):181-187.
- GUI Heng, ZHANG Pei-pei, HUA Xiao-mei, et al. Effect of transgenic soybean with sulfur-rich amino acids on soil microbial population structure[J]. *Chinese Journal of Oil Crop Sciences*, 2012, 34(2):181-187.
- [19] Siciliano S D, Germida J J. Taxonomic diversity of bacteria associated with the roots of field-grown transgenic *Brassica napus* cv. Quest, compared to the nontransgenic *B. napus* cv. Excel and *B. rapa* cv. Parkland[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 1999, 29(3):263-272.
- [20] Li N, Wang H Y. 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.
- [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 microorganisms and nitrogen transformation in the rhizospheric soil[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2010, 29(7):1341-1345.
- [22] 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]. 生态学杂志, 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 soil[J]. *Chinese Journal of Ecology*, 2010, 29(9):1736-1742.
- [23] 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 Agricultural Science Bulletin*, 2011, 27(1):100-104.
- [24] 刘志华, 徐广惠, 王宏燕, 等. 抗草甘膦转基因大豆对根际土壤氨氧化古菌群落多样性的影响[J]. 生态学杂志, 2012, 31(10):2479-2485.
- LIU Zhi-hua, XU Guang-hui, WANG Hong-yan, et al. Effects of roundup ready transgenic soybean on ammonia-oxidizing archaeal diversity in rhizospheric soil[J]. *Chinese Journal of Ecology*, 2012, 31(10):2479-2485.
- [25] Fang M, Motavalli P P, Kremer R J, et al. Assessing changes in soil microbial communities and carbon mineralization in *Bt* and non *Bt* corn residue-amended soils[J]. *Applied Soil Ecology*, 2007, 37:150-160.
- [26] Alexei Melnitchouck, Peter Leinweber, Inge Broer, et al. Pyrolysis-field ionization mass spectrometry of genetically modified plants on soil-organisms[J]. *Environmental Biosafety Research*, 2006, 5:37-46.
- [27] Donegan K, Schaller D L, Stone J K, et al. Microbial populations, fungal species diversity and plant pathogen levels in field plots of potato plants expressing the *Bacillus thuringiensis* var. *tenbrionis* endotoxin[J]. *Transgenic Research*, 1996, 5:25-35.
- [28] Devar M, Londono R, Thies J E. Neither transgenic *Bt* maize(MON863) nor tefluthrin insecticide adversely affect soil microbial activity or biomass: A3-year field analysis[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2007, 39(8):2038-2047.
- [29] Heuer H, Kroppenstedt R M, Lottmann J, et al. Effects of T4 lysozyme release from transgenic potato roots on bacterial rhizosphere communities are negligible relative to natural factors[J]. *Applied Environmental Microbiology*, 2002, 68:1325-1335.
- [30] Kremer R J, Means N E. Glyphosate affects soybean root exudation and rhizosphere microorganisms[J]. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 2005, 85(15):1165-1174.
- [31] Saxena D, Stotzy 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.