

aadA 叶绿体转化烟草对根际微土壤生物的影响

郭长虹, 刘庆国, 刘佳莉, 束永俊, 吕月萍, 余建平

(哈尔滨师范大学 生命科学与技术学院, 黑龙江省分子细胞遗传与遗传育种重点实验室, 150025 哈尔滨)

摘要: 为研究叶绿体转基因烟草对土壤根际微生物的影响, 以 *aadA* 叶绿体转基因烟草和对照烟草为实验材料, 对苗期、花期、成熟期烟草根际细菌、放线菌及真菌的菌落数进行统计, 利用 Biolog 法分析微生物群落功能多样性. 结果表明: 在相同生育期, *aadA* 叶绿体转基因烟草与对照烟草相比, 根际土壤细菌、放线菌及真菌数量均无显著差异; 根际土壤微生物群落的代谢相似, 转基因烟草对微生物群落功能的影响不显著. *aadA* 叶绿体转基因烟草没有对土壤微生物数量和功能多样性产生显著的影响.

关键词: 叶绿体转化烟草; 根际微生物; Biolog 法; *aadA* 基因

中图分类号: S-3 **文献标志码:** A **文章编号:** 0367-6234(2012)04-0141-04

Effects of *aadA* transplastomic tobacco on rhizosphere microbial communities in soil

GUO Chang-hong, LIU Qing-guo, LIU Jia-li, SHU Yong-jun, LÜ Yue-ping, YU Jian-ping

(Key Laboratory of Molecular Cytogenetics and Genetic Breeding of Heilongjiang Province, College of Life Science and Technology, Harbin Normal University, 150025 Harbin, China)

Abstract: To study the effects of *aadA* transplastomic tobacco (TA) on soil microbial communities, the quantity of bacteria, actinomycetes, and fungi was investigated at seedling stage, flowering stage, and senescing stage by plate cultivation of microorganism, and the functional diversity of rhizosphere microorganisms was detected by Biolog Ecoplate method. The results showed that there was no significant difference on the populations of bacteria, actinomycetes, and fungi between *aadA* transplastomic tobacco and non-transgenic tobacco at same growing stage. The Biolog analysis indicated that the metabolism of rhizosphere microbial community were similar, *aadA* transplastomic tobacco didn't affect the microbial community. In summary, *aadA* transplastomic tobacco had no significant effects on quantity and functional diversity of rhizosphere microorganisms in soil during one year growth.

Key words: transplastomic tobacco; rhizosphere microbial; Biolog; *aadA* gene

目前, 转基因植物风险评估^[1-2]主要集中在转基因植物与近缘物种的基因转移^[3]、目标害虫的抗性^[4], 以及对非目标生物的多样性和生态系统的影响^[1,2,5]. 土壤是生态系统中物质循环和能量转化过程的重要场所, 而土壤生物多样性与活

性是该系统保持健康稳定的基础^[6]. 转基因作物根系分泌物的释放有可能引起微生物多样性和结构的改变, 所以, 转基因作物对土壤生态环境、土壤微生物群落结构和多样性的改变是转基因作物生态评价中重要的内容^[7]. 到目前为止, 研究主要集中在核转基因植物对土壤微生物的影响, 而叶绿体转基因植物对土壤微生物影响的报道很少. 由于叶绿体基因组的拷贝数高, 叶绿体转基因植物的外源基因表达量非常大, 可达核转基因植物的几十倍、甚至几百倍. 大量的外源基因表达产物进入土壤, 可能使土壤微生物群落结构发生变

收稿日期: 2011-10-23.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30970552); 黑龙江省高校科技创新团队研究计划项目 (2010TD10); 哈尔滨师范大学科技创新团队研究计划项目 (KJTD-2011-2).

作者简介: 郭长虹 (1968—), 女, 教授, 博士生导师.

通讯作者: 郭长虹, kaku2008@hotmail.com.

化,最终导致生态系统功能的改变.因此,评价叶绿体转基因植物对土壤微生物群落的影响具有重要的生态学意义.

本研究以 *aadA* 基因叶绿体转化烟草为材料,利用微生物稀释平板法和 Biolog 检测,比较 *aadA* 基因叶绿体转化烟草与对照烟草在苗期、花期和成熟期土壤微生物群落和功能的变化,为评价叶绿体转基因烟草对土壤生态系统的影响提供依据.

1 试 验

1.1 植物材料及种植

叶绿体转基因烟草(转 *aadA* 基因,TA)及对照烟草(WT)由本实验室提供.田间种植采用完全随机区组,3个重复,转基因烟草和非转基因烟草相间种植.

1.2 土壤采集

分别在烟草的苗期、花期、成熟期随机抽取大田种植的烟草,采用抖落法取根系表层1~2 mm 土壤^[8],每次每个重复取3株烟草并将其根际土壤混合,过2 mm 土壤筛备用.

1.3 微生物数量测定

采用平板稀释分离培养法.土壤微生物数量分细菌、真菌和放线菌3大类群测定,采用平板稀释法统计数量.细菌用牛肉膏蛋白胨培养基培养;真菌用孟加拉红培养基培养;放线菌用高氏一号培养基培养^[9].

1.4 Biolog 分析

称取5 g 土壤加入到装有45 mL 灭菌 NaCl 溶液的三角瓶中(浓度为0.145 mol/L),然后在旋转振荡器上震荡30 min 摇匀.土壤溶液依次稀释至 10^{-3} ,向 Biolog EcoPlate (美国 BIOLOG 公司)上每孔加入150 μ L 土壤稀释液,然后在室温条件下(28 $^{\circ}$ C)将微孔板放在保湿容器中避光培养,每隔24 h 用酶标仪读取在590 nm (颜色+浊度)和750 nm (浊度)波长的数值.

单孔平均光密度值计算按照 Garland 和 Mills 的方法^[10],即每孔平均吸光度变化率 R_{AWCD} (590 ~750 nm) = $\Sigma(C_{590 \sim 750})/31$,其中31为 Biolog EcoPlate 上供试碳源的种类数.

采用培养96 h 的数据计算微生物群落的多样性指数^[11].Shannon 指数 H' 用于评估丰富度, $H' = -\Sigma(P_i \times \ln P_i)$ $E = H'/\ln s$,其中 P_i 为第 i 孔的相对吸光值与整个平板相对吸光值总和的比率, s 为颜色变化孔的数目;Simpson 指数 D 是用于评估常见种优势度的指数, $D = 1 - \Sigma(P_i \times P_i)$,其中 P_i 为第 i 孔的相对吸光值与整个平板相对吸光值总和的比率;Mcintosh 指数 U 是基于群落物种多维空间距离的多样性指数,为一致性的量度, $U = \sqrt{(\Sigma n_i \times n_i)}$,其中 n_i 为第 i 孔的相对吸光值.

1.5 数据分析

所有数据均用 Excel 和 SPSS 16.0 软件进行数据分析处理和差异统计学意义分析($P < 0.05$ 差异有统计学意义).同列数据后具有相同字母者,表示在0.05水平上差异无统计学意义. R_{AWCD} 折线图采用 SigmaPlot 2000 软件,PCA 图由 MATLAB 软件做出.

2 结果与分析

2.1 *aadA* 叶绿体转基因烟草对根际土壤微生物数量的影响

对苗期、花期、成熟期土壤中微生物数量进行统计(表1).结果表明,在各个生育期内,细菌数量苗期最小,花期最大,成熟期有所降低;放线菌、真菌数量苗期最低,花期增加,成熟期最大.所有在3个不同时期的WT根际微生物的数量均略高于TA根际的微生物数量,这一趋势很明显,但都没有达到差异有统计学意义水平.说明在试验期间 *aadA* 叶绿体转化烟草的种植对各个时期的根际土壤微生物数量没有影响.

表 1 烟草根际微生物数量分析

品系	细菌/ 10^8			放线菌/ 10^7			真菌/ 10^5		
	苗期	花期	成熟期	苗期	花期	成熟期	苗期	花期	成熟期
TA	0.98 $\pm$ 0.19a	2.53 $\pm$ 0.23a	1.47 $\pm$ 0.21a	0.82 $\pm$ 0.24a	1.41 $\pm$ 0.09a	2.42 $\pm$ 0.50a	0.68 $\pm$ 0.13a	1.10 $\pm$ 0.21a	2.22 $\pm$ 0.34a
WT	1.19 $\pm$ 0.39a	2.72 $\pm$ 0.20a	1.61 $\pm$ 0.26a	0.90 $\pm$ 0.10a	1.49 $\pm$ 0.14a	2.98 $\pm$ 0.13a	0.70 $\pm$ 0.21a	1.14 $\pm$ 0.15a	2.24 $\pm$ 0.58a

a 表示同列数据比较差异无统计学意义.

2.2 *aadA* 叶绿体转基因烟草对根际土壤微生物活性的影响

对苗期、花期、成熟期 *aadA* 叶绿体转基因烟草土壤微生物进行 Biolog 分析(图1).结果表明,各个时期内 *aadA* 叶绿体转化烟草根际土壤微生物群

落的 R_{AWCD} 变化曲线与野生型烟草根际土壤的 R_{AWCD} 变化曲线接近吻合.说明在试验期间 *aadA* 叶绿体转化烟草对土壤微生物的整体活性影响很小,转基因烟草根际土壤中的微生物群落对微平板上碳底物利用的能力和对照土壤差异无统计学意义.

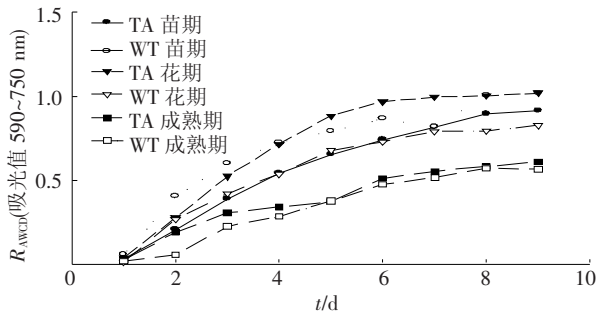


图1 不同生育期烟草根际土壤微生物 R_{AWCD} 随时间的变化

2.3 土壤微生物群落功能多样性分析

进一步对不同生育期烟草土壤细菌群落 Biolog EcoPlate 底物碳源代谢主成分进行了分析(图2). 结果表明, *aadA* 叶绿体转基因烟草和对照烟草在苗期、花期和成熟期主成分都有交集,说明在这3个时期转基因与非转基因烟草根际土壤细菌群落对底物碳源的代谢特征差异无统计学意义.

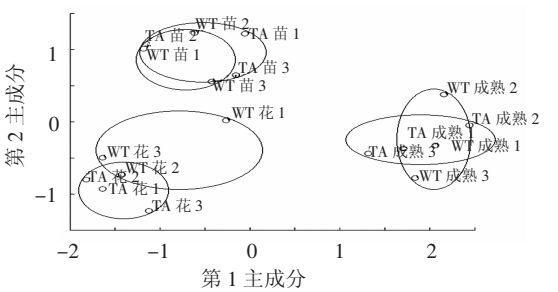


图2 不同生育期烟草土壤微生物群落碳源利用的主成分分析

对苗期、花期、成熟期3个时期两种土壤微生物功能多样性进行了分析(表2). 结果表明, *aadA* 叶绿体转化烟草和野生型烟草根际微生物种群在 Shannon 指数、Simpson 指数、Mcintosh 指数和 Shannon 均匀度方面差异无统计学意义. 说明在试验期间 *aadA* 叶绿体转化烟草的种植对根际土壤微生物功能多样性没有影响.

表2 根际微生物群落多样性指数分析

样品		Shannon 指数	Shannon 均匀度	Simpson 指数	Mcintosh 指数
苗期	TA	3.089 ± 0.088	0.899 ± 0.026	0.950 ± 0.004	0.223 ± 0.010
	WT	3.147 ± 0.023	0.916 ± 0.006	0.954 ± 0.002	0.214 ± 0.004
花期	TA	3.235 ± 0.030	0.942 ± 0.009	0.959 ± 0.001	0.204 ± 0.002
	WT	3.119 ± 0.157	0.908 ± 0.046	0.951 ± 0.009	0.221 ± 0.021
成熟期	TA	3.001 ± 0.102	0.874 ± 0.030	0.924 ± 0.015	0.274 ± 0.026
	WT	2.850 ± 0.084	0.830 ± 0.025	0.933 ± 0.005	0.258 ± 0.009

3 讨论

自转基因作物商业化种植以来,其对环境的影响一直备受关注. 现已知多种作物的多个转基因品系及其残体可以改变作物土壤微生物群体的组成,但这些改变也同时受田间土壤性质、季节变化和评估方法等的影响^[12]. Yudina 等^[13]发现4种不同转 Bt 基因棉花促使了土壤中细菌和真菌数量发生短暂性的显著增加. Dunfield 和 Gernuda^[14]研究了在加拿大的4个不同田块连续两年种植4种转抗除草剂基因的油菜和4种常规油菜品种对根际微生物多样性的影响. 结果表明,转基因油菜品种细菌群落与常规品种有差异. 转基因油菜的根际微生物群落在一些脂肪酸上显著偏高,表明其微生物群落组成发生了变化. 近年来,国内学者也陆续报道了转基因植物对土壤微生物的影响的研究成果. 王洪兴等^[15]的研究表明,土壤中施入转 Bt 基因稻秆后细菌数量显著低于施入非转基因稻秆后土壤中的细菌数量,但对于真菌结果正好相反,放线菌数量变化差异无统计学意义. 沈法富等^[7]在大田栽培条件下,连续两年测定棉花不同发育时期转 Bt 基因抗虫棉 GK12 和对照品种泗棉三号之间对土壤微生物的影响,

结果表明,转基因抗虫棉根际微生物和细菌生理群的数量发生了变化,且根际细菌生理群分布的均匀度下降. 袁红旭等^[16]对转几丁质酶和葡聚糖酶双价抗真菌基因水稻种植后的根际土壤微生物群落进行了分析. 结果表明,转基因水稻根际土壤中真菌和细菌数量明显少于非转基因对照,与常规水稻品种数量接近. 陈敏等^[17]的研究结果显示,转 Bt 水稻根际土壤的细菌生理类群无论在数量或是结构组成上均明显不同于常规水稻. 李本金等^[18]通过温室模拟试验,评估了抗真菌转基因水稻对根际土壤细菌、放线菌、真菌数量的影响. 结果表明,在水稻整个生长发育过程中,供试转基因水稻根际土壤细菌、放线菌、真菌数量与相应非转基因水稻相比差异无统计学意义. 本研究以 *aadA* 叶绿体转基因烟草和非转基因对照烟草为材料,分别于苗期、花期、成熟期对种植在大田中的 *aadA* 叶绿体转基因烟草与对照烟草根际土壤可培养的微生物进行了分析. 结果表明,所有在3个不同时期的 WT 根际微生物的数量均要略高于 TA 根际的微生物数量,但都没有达到差异统计学意义水平,说明在试验期间 *aadA* 叶绿体转基因与对照植株根际土壤微生物在数量上差异无统计学意义.

微生物功能多样性信息对于明确不同环境中微生物群落的作用具有重要意义. 以 Biolog 微孔板碳源利用为基础的定量分析为描述微生物群落功能多样性提供了一种更为简单、快速的方法, 并广泛应用于评价土壤微生物群落的功能多样性^[19-21]. Griffiths 等^[22]利用 Biolog 法研究表明, 转凝集素基因马铃薯对根际微生物群落功能多样性没有产生影响. 阮妙鸿等^[23]利用 Biolog 结合微生物的平板培养研究了转 ScMV-CP 基因甘蔗对根际土壤微生物的影响. 结果表明, 转基因甘蔗对土壤微生物的数量和均匀度有一定影响, 但对其活性和多样性则影响不明显. 本研究利用 Biolog 技术分析了 *aadA* 叶绿体转基因烟草的种植对根际土壤微生物群落功能多样性的影响. 结果表明, 在 3 个不同时期 *aadA* 叶绿体转基因烟草与对照烟草根际土壤微生物在 R_{AWCD} 变化曲线、主成分、微生物群落指数等方面均有一定差异, 但差异均没有达到统计学意义水平. 说明在试验期间 *aadA* 叶绿体转基因烟草的种植对根际微生物群落功能多样性没有影响.

本研究首次在大田条件下研究了不同生育期 *aadA* 叶绿体转基因烟草对土壤微生物数量和功能多样性的影响. 今后, 还将对不同基因型的叶绿体转基因烟草采用更多的方法(如 DGGE), 进行更长时间的跟踪, 从而更加全面、客观地评价叶绿体转基因植物对土壤微生物群落的影响.

参考文献:

- [1] WOLFENBARGER L L, PHIFER P R. The ecological risks and benefits of genetically engineered plants[J]. Science, 2000, 290: 2088-2093.
- [2] 钱迎清, 魏伟, 桑卫国, 等. 转基因作物对生物多样性的影响[J]. 生态学报, 2001, 21(3): 337-343.
- [3] 魏伟, 钱迎清, 马克平. 转基因作物与其野生亲缘种间的基因流[J]. 植物学报, 1999, 41(4): 343-349.
- [4] HILDER V A, BOULTER D. Genetic engineering of crop plants for insect resistance: a critical reviews[J]. Crop Prot, 1999, 18: 177-191.
- [5] 钱迎清, 马克平. 经遗传修饰生物体的研究进展及其释放后对环境的影响[J]. 生态学报, 1998, 18(1): 1-9.
- [6] 肖慈英, 阮宏华, 屠六邦. 宁镇山区不同森林土壤生物学特性的研究[J]. 应用生态学报, 2002, 13(9): 1077-1081.
- [7] 沈法富, 韩秀兰, 范术丽. 转 Bt 基因抗虫棉根际微生物区系和细菌生理群多样性的变化[J]. 生态学报, 2004, 24(3): 432-437.
- [8] 张美俊, 杨武德, 李燕娥. 不同生育期转 Bt 基因棉种植对根际土壤微生物的影响[J]. 植物生态学报, 2008, 32(1): 197-203.
- [9] 中国科学院南京土壤研究所微生物室. 土壤微生物实验法[M]. 北京: 科学出版社, 1985: 40-75.
- [10] GARLAND J L, MILLS A L. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community level sole carbon source utilization[J]. Appl Environ Microbiol, 1991, 57: 2351-2359.
- [11] 杨永华, 姚健, 华晓梅. 农药污染对土壤微生物群落功能多样性的影响[J]. 微生物学杂志, 2000, 20(2): 23-25.
- [12] 唐影, 李世东, 缪作清. 转基因作物对土壤微生物的影响[J]. 中国生物防治, 2007, 23(4): 383-390.
- [13] YUDINA T G, BURTSEVA L I. Activity of delta-endotoxins of four *Bacillus thuringiensis* subspecies against pokaryotes[J]. Microbiol, 1997, 66: 25-31.
- [14] DUNFIELD K E, GERMIDA J J. Diversity of bacterial communities in the rhizosphere and root interior of field grown genetically modified *Brassica napus*[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2001, 38: 129.
- [15] 王洪兴, 陈欣, 唐建军, 等. 转 Bt 基因水稻秸秆降解对土壤微生物可培养类群的影响[J]. 生态学报, 2004, 24(1): 89-94.
- [16] 袁红旭, 张建中, 郭建夫, 等. 种植转双价抗真菌基因水稻对根际微生物群落及酶活性的影响[J]. 土壤学报, 2005, 42(1): 122-126.
- [17] 陈敏, 应文荷. 转 Bt 水稻与常规水稻根际土壤细菌类群的比较研究[J]. 杭州师范学院学报: 自然科学版, 2005, 4(4): 290-292.
- [18] 李本金, 李玥仁, 胡奇勇, 等. 抗真菌转基因水稻对根际土壤微生物群落的影响[J]. 福建农林大学学报: 自然科学版, 2006, 35(3): 319-323.
- [19] GARLAND J L. Analysis and interpretation of community level physiological profiles in microbial ecology[J]. FEMS Microbiol Ecology, 1997, 24: 289-300.
- [20] HOLLIBAUGH J T. Relationship between thymidine metabolism, bacteroplankton community metabolic capabilities, and sources of organic matter[J]. Microb Ecology, 1994, 28: 117-131.
- [21] JELLETTE J F, LI W K W, DICKIE P M, et al. Metabolic activity of bacterioplankton communities assessed by flow cytometric and single carbon substrate utilization[J]. Mar Ecol Prog Ser, 1996, 136: 213-225.
- [22] GRIFFITHS B S, GEOGHEGAN I E, ROBERTSON W M. Testing genetically engineered potato producing the Lectins GNA and ConA on non-target soil organisms and proceecs[J]. Jappl Ecol, 2000, 37: 159-170.
- [23] 阮妙鸿, 许燕, 郑瑶, 等. 转 ScMV-CP 基因甘蔗对土壤微生物的影响[J]. 热带作物学报, 2008, 29(2): 187-191.

(编辑 刘 彤)