

GFP 叶绿体转化烟草茎叶降解对土壤微生物数量及土壤酶活性的影响

余建平, 吕月萍, 刘佳莉, 刘庆国, 郭长虹*

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

摘要:以 *GFP* 叶绿体转基因烟草及对照烟草(非转基因烟草)为材料,在实验室条件下研究了叶绿体转基因烟草及对照烟草(非转基因烟草)在茎叶降解过程中及完全降解后对土壤微生物主要类群(细菌、真菌、放线菌)的影响,并对相关的土壤酶活性进行了分析。结果表明,在烟草茎叶降解过程中及完全降解后:(1)叶绿体转基因烟草及对照烟草(非转基因烟草)对微生物的数量影响不显著;(2)土壤微生物总量相比为细菌>放线菌>真菌;(3)叶绿体转基因烟草茎叶降解对土壤酶活性没有显著影响;(4)*GFP* 基因没有水平转移到土壤微生物基因组中。以上结果显示 *GFP* 叶绿体转化烟草茎叶降解对土壤微生物数量及土壤酶活性没有显著的影响。

关键词:叶绿体转化烟草;根际微生物;茎叶降解;*GFP* 基因;土壤酶

中图分类号:X53 文献标志码:A 文章编号:1672-2043(2011)03-0508-05

Effects of the Stem and Leaf Decomposition of *GFP* Transplastomic Tobacco on Microorganism Populations and Enzymes Activity in Soil

YU Jian-ping, LV Yue-ping, LIU Jia-li, LIU Qing-guo, GUO Chang-hong*

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

Abstract: The development and use of genetically modified plants (GMPs) have been a topic of considerable public debate in recent years. And there are many studies addressing potential risks of GMP cultivation, most of which have addressed only aboveground effects. However, there are few studies that evaluate the effects of the residue decomposition of transplastomic tobacco on microorganism populations and enzymes activity in soil. To study the effect of the transplastomic tobacco residue on the soil ecological environment, the communities of bacteria, fungi and actinomycetes and soil enzyme activities were investigated between the *GFP* transplastomic tobacco plants and the controls (non-genetically modified tobacco) during and after their stems and leaves complete decomposition. The results showed: (1) The effect of transplastomic tobacco and control tobacco to major microbial groups in amount was not significantly different. (2) No matter transplastomic tobacco or controls, the microbial number was bacteria>actinomycete>fungi. (3) Soil enzyme activities were not affected by stem and leaf decomposition of *GFP* transplastomic tobacco. (4) No *GFP* gene had transferred to soil microbial. These results suggested that decomposition of *GFP* transplastomic tobacco residue had no distinct effect on microorganism populations and enzymes activity in soil.

Keywords: transplastomic tobacco; rhizosphere microbial; stem and leaf decomposition; *GFP* gene; soil enzymes

自 1983 年首次获得转基因马铃薯、烟草以来,转基因技术在农业生产中得到了越来越广泛的应用。将外源目的基因导入叶绿体基因组的技术已发展成为

植物基因工程的新增长点。与常规的细胞核转化相比,叶绿体转化的优点在于:叶绿体中以多拷贝形式存在的外源基因可实现高水平表达,通常比细胞核转化的表达量高出几十倍,甚至几百倍^[1-2]。通过叶绿体转化还可使外源基因定点整合在基因间隔区,不至于破坏植物的正常基因功能,从而消除了随机整合所造成的不利影响^[3]。由于叶绿体的母系遗传特点,花粉中几乎不存在外源基因,转基因植物的安全性将会提高

收稿日期:2010-09-04

基金项目:国家自然科学基金(30970552)

作者简介:余建平(1985—),女,吉林四平人,硕士研究生,主要从事叶绿体转化烟草对土壤环境影响的研究。

E-mail:yujianping2003@163.com

* 通讯作者:郭长虹 E-mail:kaku3008@yahoo.com.cn

很多。但转基因作物的大面积种植极有可能对农林生态系统产生多方面的危害,因此对其释放后的生态风险评价极为必要。Jepson 等提出要研究转 BT 基因植物的产物对地上和地下生物的影响^[4]。由于作物本身只有一部分被收获,大部分则会重新返回土壤,而且作物残体在土壤中的降解产物也可能对微生物群落产生一系列影响^[5]。因此,评价转基因作物对土壤生态系统的影响是非常重要的。目前,关于叶绿体转基因烟草对土壤微生物的影响的研究还很少,需要建立不同的研究方法进行探讨。

本文以 *GFP* 叶绿体转基因烟草及对照烟草(非转基因烟草)为材料,在实验室条件下研究了叶绿体转基因烟草及对照烟草(非转基因烟草)在茎叶降解过程中及完全降解后对土壤微生物主要类群及土壤酶活性的影响。

1 材料与方法

1.1 材料准备

供试土壤:取自哈尔滨师范大学试验田(未种植过转基因烟草)0~15 cm 土层。取回的土壤置于室温自然晾干,磨碎过筛(8 目),分装入花盆(花盆尺寸:底直径×高×上口直径=12 cm×19 cm×18 cm),每盆栽土 2 kg。

植物材料:叶绿体转基因烟草(转 *GFP* 基因, TG)由本实验室创建并保存;非转基因烟草(Xanthi, WT)。将转基因烟草和非转基因烟草的茎叶(各 30 g)剪成大约 1 cm² 后分别装入纱袋中埋入过筛土壤,各处理 4 盆。

1.2 取样

将样品于室温下(20℃)恒温培养,培养过程中保持土壤含水量一致。在 150、180 d 后取样,至 180 d 茎叶已经完全降解。取出纱袋,收集纱袋周围的土壤充分混匀过筛(20 目)用于实验。

1.3 微生物测定

微生物培养采用常规的培养方法,细菌用牛肉膏蛋白胨培养基、放线菌用高氏培养基、真菌用孟加拉红培养基进行培养^[6],用平板计数法统计数量。

1.4 土壤脲酶、纤维素酶活性测定

脲酶采用苯酚-次氯酸比色法^[7];纤维素酶采用 DNS 测定方法^[8]。

1.5 土壤 DNA 的提取及 PCR 扩增

采用超纯土壤基因组 DNA 快速提取试剂盒(北京庄盟国际生物基因科技有限公司)提取土壤 DNA。

PCR 反应程序:94℃ 4 min, 94℃ 30 s, 54℃ 30 s, 72℃ 1 min, 30 个循环, 72℃ 10 min。扩增产物采用 *GFP* 基因特异引物 P1:5'-GCAGTGCTTCAGCCGC-TACC-3'; P2:5'-CTTCTCGTTGGGCTCTTT GC-3'。1.2% 琼脂糖电泳检测产物。

1.6 统计分析方法

采用 SPSS16.0 统计软件进行统计分析,差异显著性水平为 $P < 0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 茎叶降解对土壤细菌、放线菌、真菌数量的影响

对茎叶降解过程中至完全降解后土壤细菌、放线菌、真菌数量的影响进行了分析(图 1 和图 2)。在降解过程中, TG 和 WT 的根际细菌、放线菌、真菌数量

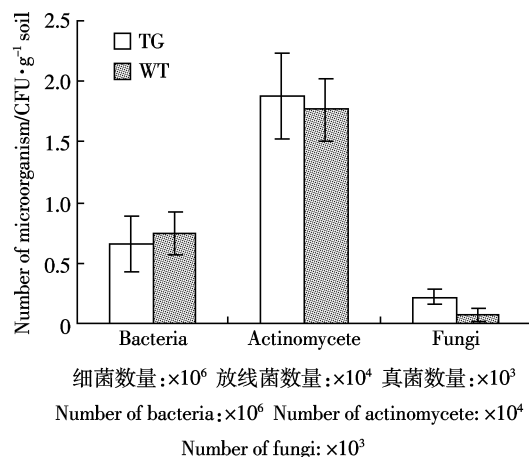


图 1 叶绿体转化烟草茎叶降解对土壤微生物数量的影响(150 d)

Figure 1 Effects of the stem and leaf decomposition of transplasmic tobacco on microorganism populations in soil(150 days)

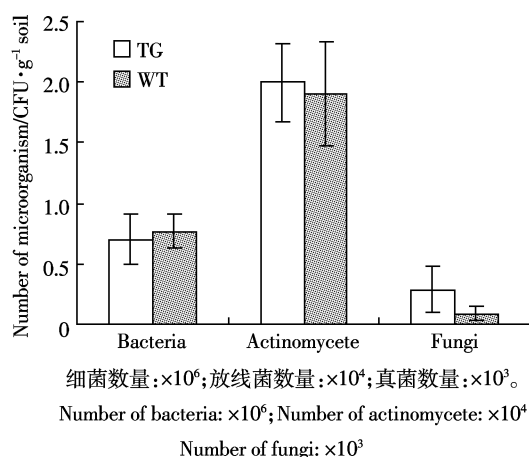


图 2 叶绿体转化烟草茎叶降解对土壤微生物数量的影响(180 d)

Figure 2 Effects of the stem and leaf decomposition of transplasmic tobacco on microorganism populations in soil(180 days)

变化趋势相似, TG 与 WT 茎叶降解对细菌、放线菌、真菌数量的影响差异不显著。说明叶绿体转基因烟草茎叶在降解过程中及完全降解后没有向土壤环境中释放有害物质, 影响土壤微生物的数量, 或是释放的物质质量很小不足以显著影响微生物的数量。180 d 时微生物数量高于 150 d, 说明茎叶降解促进了土壤微生物的生长繁殖。土壤微生物总数都是细菌>放线菌>真菌。

2.2 茎叶降解对土壤酶活性的影响

对土壤脲酶、纤维素酶活性进行了分析(图 3 和图 4)。随着掩埋天数的增加, 脲酶和纤维素酶的活性都有所增加。脲酶能促进肽键的水解, 其活性与土壤微生物的数量、有机质的含量和速效氮呈正相关, 可以表示土壤的氮素供应状况, 叶绿体转基因烟草土壤脲酶活性比对照组略低, 说明对照组氮素供应多一些; 土壤纤维素酶活性比非转基因烟草的低, 说明叶绿体转基因烟草完全降解后在一定程度上降低了土壤纤维素酶活性, 但二者活性无显著差异, 说明叶绿

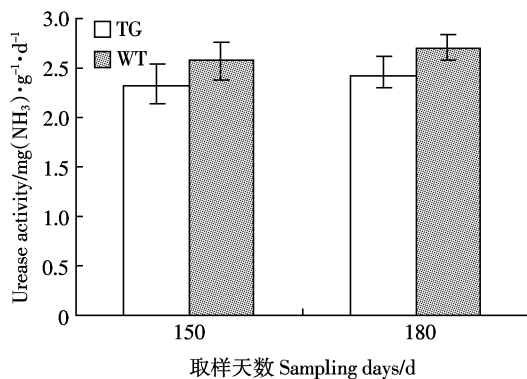


图 3 叶绿体转化烟草茎叶降解对土壤脲酶活性的影响

Figure 3 Effects of the stem and leaf decomposition of transplastomic tobacco on urease activity in soil

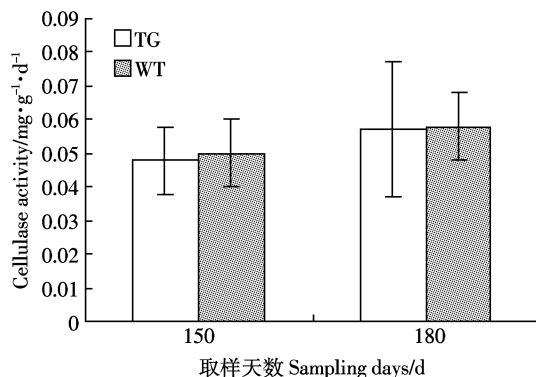


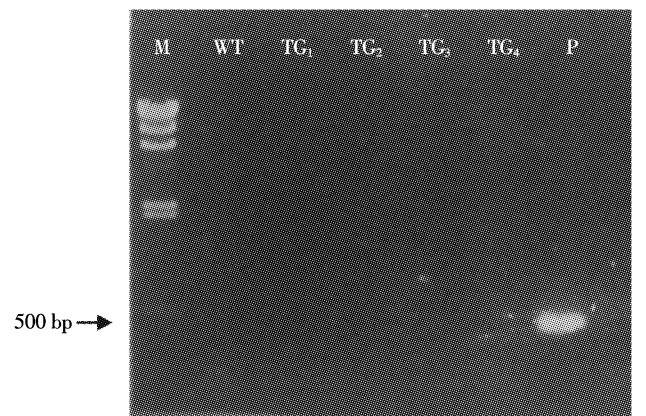
图 4 叶绿体转化烟草茎叶降解对土壤纤维素酶活性的影响

Figure 4 Effects of the stem and leaf decomposition of transplastomic tobacco on cellulase activity in soil

体转基因烟草对土壤的脲酶和纤维素酶活性的影响不大。

2.3 土壤 DNA 的 *GFP* 基因扩增

试剂盒提取的 DNA 主带较亮, 无弥散现象, 说明所提取的 DNA 较为完整, 无明显降解。用基因特异引物进行 PCR 扩增, 在阳性对照质粒中扩增出了 *GFP* 基因的产物, 而在野生型烟草和转基因烟草的土壤 DNA 样品中没有检测到 *GFP* 基因序列(图 5), 说明 *GFP* 基因在土壤中没有残留, 没有通过水平转移到微生物基因组中。



M: λ /Hind III marker; WT: 野生型烟草; TG₁~TG₄: *GFP* 叶绿体转化烟草; P: 阳性质粒

M: λ /Hind III marker; WT: wild type tobacco; TG₁~TG₄: *GFP* transplastomic tobacco; P: positive control

图 5 土壤 DNA 的 *GFP* 基因扩增结果(180 d)

Figure 5 The PCR amplification results of soil DNA with *GFP* primers(180 days)

3 讨论

土壤微生物是土壤生态系统的重要组成部分。因此, 评价转基因植物对土壤微生物的影响意义重大。Yudina 等的研究表明, 4 种不同转 Bt 基因棉花促使土壤中细菌和真菌数量发生短暂性的显著增加^[9]。Dunfield 和 Gernuda 研究了在加拿大的 4 个不同田块连续 2 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^[10], 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。沈法富等在大田栽培条件下, 连续 2 年测定棉花不同发育时期转 Bt 基因抗虫棉和对照品种对土壤微生物的影响^[11], 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。李本金等的研

究表明,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未见明显差异^[12]。陆英等通过 BIOLOG 法对转基因香蕉植株和对照植株根际土壤微生物的多样性进行了研究^[13],结果表明,转基因植株和对照植株对根际土壤中细菌、真菌、放线菌种群均没有影响。

作物枝叶还田对于土壤肥力的恢复具有重要意义,枝叶降解所释放的营养物质可以为土壤微生物提供天然的食物。但转基因作物非收获部分进入土壤,在土壤中的分解产物可能会对微生物群落产生一系列影响^[14-15]。Widmer 等利用枝叶埋入土壤法对转基因烟草中抗生素取样天数基因在土壤微生态系统中的残留进行了研究,发现 120 d 之后土壤中仍能检测到 0.14% 的外源抗生素序列^[16]。Donegan 等对转蛋白抑制剂 I 基因烟草中蛋白酶抑制剂在土壤中的残留进行了分析,发现含转基因烟草叶片的垃圾袋埋入土壤 57 d 后仍能检测到 0.05% 的蛋白酶抑制剂^[17]。由上可知,转基因作物的外源基因产物可通过残枝落叶留在土壤中,因此在转基因作物田间释放和商业化应用前必须对转基因作物降解产物进行研究,这也是转基因作物生态风险评估的重要内容。

为了消除其他菌对培养菌的影响,采用了选择性培养基,其中细菌采用牛肉膏蛋白胨培养基、真菌采用孟加拉红培养基、放线菌采用高氏一号培养基,每种菌设 4 次重复。比较叶绿体转基因植株和对照植株土壤微生物的 3 种菌(细菌、真菌、放线菌),在数目上没有显著差异,表明叶绿体转基因烟草茎叶降解对土壤微生物没有显著影响。通过土壤 DNA 的 PCR 扩增,并没有检测到外源基因序列,说明没有或很少通过水平转移到土壤微生物中,不会对土壤微生物产生影响。土壤酶在常温、常压和适宜的 pH 值条件下,能大大加快土壤中的许多重要的生物化学过程,包括腐殖物质的合成和分解,各类有机物质的水解和转化,以及有机物质和某些无机物质的氧化和还原等。这些过程与土壤中各营养元素的释放与贮存、土壤中腐殖质的形成与发育,以及土壤结构和物理状况都密切相关。实验证明叶绿体转基因烟草对土壤脲酶和纤维素酶活性的影响与对照相比差异也不显著。本试验是在实验室条件下研究黑土生态区转基因烟草与非转基因烟草茎叶降解后微生物数量上的差异以及对土壤酶活性的影响,研究成果可以作为一项评价生物安全性的指标。但实验室条件下出的成果是有局限性的,我们正进一步进行田间实验。另外,考虑到土壤类型

及气候条件的不同,我们也在着手做其他土壤类型的试验,以便得到更全面的试验结果。

4 结论

GFP 叶绿体转基因烟草茎叶降解后对土壤微生物数量及土壤酶活性的影响均不显著,微生物总量相比:细菌>放线菌>真菌;并且外源基因没有或者很少通过水平转移到土壤微生物中。

由于本文只是对土壤酶的少数指标进行了初步研究,而利用平板计数法又有一定局限性,因此,我们正在进一步利用 BIOLOG、DGGE 等方法研究叶绿体转基因植物对土壤微生物群落的影响,以期综合评价叶绿体转基因植物的生物安全性提供科学依据。

参考文献:

- [1] Kota M, Daniell H, Varma S, et al. Overexpression of the *Bacillus thuringiensis* (Bt) Cry2Aa2 protein in chloroplasts confers resistance to plants against susceptible and Bt-resistant insects[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96:1840-1845.
- [2] Staub JM, Garcia B, Graves J, et al. High yield production of a human therapeutic protein in tobacco chloroplast[J]. *Nat Biotechnol*, 2000, 18: 333-338.
- [3] McBride K E, Svab Z, Schaaf D J, et al. Amplification of a chimeric *Bacillus* gene in chloroplasts leads to an extraordinary level of an insecticidal protein in tobacco[J]. *Bio/technol*, 1995, 13:362-365.
- [4] Jepson P C, Croft B A, Pratt G E. Test systems to determine the ecological risks posed by toxin release from *Bacillus thuringiensis* genes in crop plants[J]. *Molecular Ecology*, 1994, 3(1):81-89.
- [5] 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.
WANG Hong-xing, CHEN Xin, TANG Jian-jun, et al. Influence of the straw decomposition of Bt transgenic rice on soil culturable microbial flora[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2004, 24(1):89-94.
- [6] 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.
Lab of Microbial, Nanjing Institute of Soil, Chinese Academy of Sciences. Experimental method of edaphon[M]. Beijing: Science Press, 1985: 40-75.
- [7] 关松荫.土壤酶及其研究法[M].北京:中国农业出版社,1986:264-270.
GUAN Song-yin. Soil enzymes and its research method[M]. Beijing: China Agriculture Press, 1986:264-270.
- [8] 王琳,刘国生,王琳嵩,等. DNS 法测定纤维素酶活力最适条件研究[J]. *河南师范大学学报(自然科学版)*, 1998, 26(3):215-219.
WANG Lin, LIU Guo-sheng, WANG Lin-song, et al. The optimal conditions for cellulase activity measurement with DNS method[J]. *Journal of Henan Normal University(Natural Science)*, 1998, 26(3):215-219.
- [9] Yudina TG, Burtseva LI. Activity of deltaendotoxins of four *Bacillus thuringiensis* subspecies against rokaryotes[J]. *Microbiol*, 1997, 66:25-

- 31.
- [10] Dunfield KE, Germida JJ. Diversity of bacterial communities in the rhizosphere and root interior of field grown genetically modified *Brassica napus*[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2001, 38: 1-9.
- [11] 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.
SHEN Fa-fu, HAN Xiu-lan, FAN Shu-li. Changes in microbial flora and bacterial physiological group diversity in rhizosphere soil of transgenic Bt cotton[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2004, 24(3): 432-437.
- [12] 李本金, 李钊仁, 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.
LI Ben-jin, LI Yue-ren, HU Qi-yong, et al. Effects of transgenic fungus-resistant rice on microorganism populations in rhizospheric soils[J]. *Journal of Fujian Agriculture and Forestry University(Natural Science Edition)*, 2006, 35(3): 319-323.
- [13] 陆 英, 贺春萍, 吴伟怀, 等. 转基因香蕉植株对根际土壤微生物的影响[J]. 热带作物学报, 2008, 29(1): 38-41.
LU Ying, HE Chun-ping, WU Wei-huai, et al. Effect of transgenic banana plants on the microorganism in the soil[J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2008, 29(1): 38-41.
- [14] Angle JS. Release of transgenic plants: Biodiversity and population level considerations[J]. *Molecular Ecology*, 1994, 3: 45-50.
- [15] 王洪兴, 陈 欣, 唐建军, 等. 释放后的转抗病虫基因作物对土壤生物群落的影响[J]. 生物多样性, 2002, 10(2): 232-237.
WANG Hong-xing, CHEN Xin, TANG Jian-jun, et al. Influence of transgenic pest-and disease-resistant crops on plant-associated microorganisms in soil[J]. *Biodiversity Science*, 2002, 10(2): 232-237.
- [16] Widmer F, Seidler R J, Watrud L S. Sensitive detection of transgenic plant marker gene persistence in soil microcosms[J]. *Molecular Ecology*, 1996, 5(5): 603-613.
- [17] Donegan K K, Seidler R, Fieland V J, et al. Decomposition of genetically engineered tobacco under field conditions: persistence of the proteinase inhibitor I product and effects on soil microbial respiration and protozoa, nematode and microarthropod population[J]. *Journal of Applied Ecology*, 1997, 34(3): 767-777.