

根际箱种植富含硫氨基酸转基因大豆 对土壤硫转化酶活性及微生物功能多样性的影响

刘根林^{1,2}, 戚金亮¹, 喻德跃³, 杨永华^{1*}

(1.南京大学生命科学学院, 医药生物技术国家重点实验室, 南京大学-南京林业大学 植物分子生物学联合研究所, 南京 210093;
2.江苏省林业科学研究院, 南京 211153; 3.南京农业大学国家大豆改良中心, 作物遗传与种质创新国家重点实验室, 南京 210095)

摘要:为研究转基因作物的土壤生态安全性,于根际箱中种植2组大豆(A组:转基因品系OE-8、OE-7、RNAi-3和受体南农88-1;B组:转基因品系Gaga1 17-4、Gaga1 21-8、Gaga1 57和受体N2899),采集大豆花期根际土壤,分析硫元素含量和芳基硫酸酯酶活性,并采用Biolog微平板法,研究相比于受体,转基因品系对土壤微生物群落功能多样性的影响。结果表明:OE-8和RNAi-3与其受体相比,根际土壤硫元素含量显著降低;2组组内对比结果显示,根际土样芳基硫酸酯酶活性差异均不显著。Biolog GN/GP/FF/ECO系统及多样性指数分析显示:A组中RNAi-3根际土壤微生物群落活性显著低于受体,微生物群落的丰富度、多样性和均度显著降低,OE-7根际土壤微生物群落的丰富度和均度显著降低;B组中Gaga1 57和Gaga1 17-4根际土壤微生物群落的丰富度、多样性和均度显著下降。

关键词:土壤;硫;芳基硫酸酯酶;微生物;功能多样性

中图分类号:S154.36 文献标志码:A 文章编号:1672-2043(2014)01-0103-08 doi:10.11654/jaes.2014.01.013

Effects of Sulfur Amino Acids-rich Transgenic Soybean on Sulfur Transforming Enzyme Activity and Microbial Functional Diversity in Soil

LIU Gen-lin^{1,2}, QI Jin-liang¹, YU De-yue³, YANG Yong-hua^{1*}

(1.State Key Laboratory of Pharmaceutical Biotechnology, School of Life Science, NJU-NJFU Plant Molecular Biology Institute, Nanjing University, Nanjing 210093, China; 2.Jiangsu Academy of Forestry, Nanjing 211153, China; 3.National Center for Soybean Improvement, State Key Laboratory of Crop Genetics and Germplasm Enhancement, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: Growing transgenic crops may have ecological consequences. In order to evaluate soil ecological risks of transgenic crops, a rhizo-box experiment was carried out to examine sulfur content, arylsulfatase activity, and microbial functional diversities in the rhizospheric soils grown with two groups of soybean: Group A (transgenic lines OE-8, OE-7, RNAi-3 and their recipient Nannong 88-1 as CK-1) and Group B(transgenic lines Gaga1 17-4, Gaga1 21-8, Gaga1 57 and their recipient N2899 as CK-2). At florescence stage, the content of sulfur in the rhizospheric soils of OE-8 and RNAi-3 was significantly lower than that of CK. Arylsulfatase activity had no significant difference between transgenic lines and their CKs. The Biolog analysis (GN/GP/FF/ECO systems) showed that the average well color developments(AWCDs) of rhizospheric soil of Line RNAi-3 in the Group A were significantly lower than the control, illustrating that planting Line RNAi-3 inhibited the physiology of soil Gram-negative(G^-) bacteria, Gram-positive(G^+) bacteria and fungi. However, in Group B the AWCDs values of Gaga1 21-8 significantly increased, implying that planting Line Gaga1 21-8 stimulated the physiology of soil G^+ bacteria. Compared with the control, the richness, diversity and evenness of soil microbial community in Line RNAi-3 were all significantly lower; and the richness and evenness in Line OE-7 were also significantly declined. Significant reduction in the richness, diversity and evenness in both Line Gaga1 57 and Line Gaga1 17-4 was observed. It is concluded that growing transgenic soybeans has negative impacts on soil microbial activities and microbial functional diversity in rhizospheric soils.

Keywords: soil; sulfur; arylsulfatase; microbe; functional diversity

收稿日期:2013-06-13

基金项目:国家转基因生物新品种培育重大专项(2008ZX08011-003);教育部创新团队项目(IRT1020);教育部高校科技创新工程重大项目培育资金(707027)

作者简介:刘根林(1963—),男,江苏姜堰人,在读博士,副研究员,研究方向为土壤微生物。E-mail:rootwoods2004@yahoo.com.cn

* 通信作者:杨永华 E-mail:yangyh@nju.edu.cn

作为陆地生态系统中不可或缺的组成部分,土壤微生物群落在其中起着非常重要的作用,环境中许多生物及非生物因素的变化都有可能成为改变土壤微生物群落结构及功能多样性的策动力^[1]。因此,土壤微生物研究对土壤生态安全性的监控和土壤环境状况的总体评估等,具有较大的潜在意义。植物通过根系分泌物、老死的根系以及其他残留于土壤中的植株部分影响土壤微生物群落。转基因作物可能通过其植物生理特性的变化,影响土壤微生物的生理代谢,进而影响其群落结构和土壤生态系统的功能。

前人就转基因作物对土壤微生物多样性及功能影响的研究,经过了一个由基本到复杂的过程,所采用的方法包括微生物计数、总体微生物生物量测定、呼吸测定、氮矿化测定、底物诱导的呼吸分析、酶活性测定、群落水平生理特征测定以及 PLFA 法等,均取得了一些成果^[2-3]。大豆是营养丰富的食物,但是大豆的氨基酸中缺乏含硫氨基酸^[4]。通过对大豆品种南农 88-1 内源基因 CG-3(β -伴大豆球蛋白 α 亚基基因)的过表达,引起富含 S 氨基酸的增加,从而育成了 3 个转基因品系 OE-8、OE-7 和 RNAi-3^[5];通过花粉管将非洲菊花器官发育调节基因 *gaga1* 导入大豆品种 N2899,引起大豆的球蛋白组成变化和富含 S 氨基酸增加,从而育成了 3 个转基因品系 *Gaga1* 17-4、*Gaga1* 21-8 和 *Gaga1* 57^[6]。但关于转基因大豆的生态安全性研究起步则较晚,其对根际土壤微生物的影响研究报道也较少^[7]。我国大豆种质资源十分丰富,具有得天独厚的开发转基因大豆新品种的优势,故而迫切需要构建转基因大豆商业化种植的土壤微生物生态安全评价体系。本研究以转基因大豆种植为例,从转基因生物的生态安全出发,探讨了转基因大豆种植对土壤微生物群落的影响。

Biolog 微平板法,作为描述微生物群落功能变化上一个重要的方法,可阐明土壤微生物群落代谢其底物的动力学特征。1991 年,Garland 和 Mills 第一次在土壤微生物群落多样性的分析上利用了 Biolog 检测技术^[8],近年来该技术主要应用于土壤环境微生物群落比较研究^[9],评价土壤耕作方式及经营管理方法对微生物群落及其代谢功能的影响^[10],研究转基因农作物、外来有害入侵植物对土壤微生物群落的冲击^[2,11]。本研究运用 Biolog GN/GP/FF/ECO 微平板法,通过根际箱种植,对上述 2 组富含 S 氨基酸转基因大豆土壤微生物群落的功能多样性进行了研究,以期对评价这 2 组转基因大豆的生态安全性提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 种植设计及样品采集

试验于 2010 年在江苏省南京市浦口区南京农业大学大豆改良中心试验场内实施,试验田为封闭的铁丝网室,院外 300 m 范围内无其他大豆种植。试验结束后,所有转基因试验材料在专门的焚烧炉中焚毁。所用材料有 2 组:A 组是以南农 88-1(CK-1)为受体的 OE-8、OE-7、RNAi-3 等 3 个品系,B 组是以 N2899(CK-2)为受体的 *Gaga1* 17-4、*Gaga1* 21-8、*Gaga1* 57(简称 17-4、21-8、57)等 3 个品系。试验中每个品种(系)设 3 到 4 个重复。所有大豆品种于 2010 年在根际箱中秋播种植,根际箱中土壤采自试验田,为均匀混合的过筛表土(0~20 cm),理化性质如下:土壤含水量 20%,土壤 pH 值 6.89,土壤总碳 11.5 g·kg⁻¹、总磷 560.0 g·kg⁻¹、总氮 1.2 g·kg⁻¹,其中铵态氮 7.6 mg·kg⁻¹,硝态氮 1.3 mg·kg⁻¹。每个受体及其转基因品系都播种在 12 个根际箱中,播种深度 3~4 cm,每个根际箱中播种 3~4 粒大豆种子。大豆出苗后保持每个根际箱定苗两株,除必要的浇水和除草外,所有大豆品种(系)均不作其他处理。本研究中所使用的根际箱参考 Li 等^[12]的设计,每个根际箱长 20 cm,宽 15 cm,深 20 cm。根际箱共有 5 个分区,带 4 道尼龙网(300 目)。尼龙网阻挡根生长时透过,但可进行水和矿质营养交换。3 个大的分区(两边大区宽均为 7 cm,中间区宽 4 cm)由 2 个 1 cm 宽的小区间分隔开。大豆种植在中间区,根际土壤采自相邻的 2 个 1 cm 宽的小区间。

土壤样品采集方法如下:花期(9 月 23 日),在根际箱大豆种植中心区两侧根际区采集土壤。每个转基因品系及受体均重复采集 3~4 次。土壤样品装入密封袋中密封保存,并尽快运至实验室。土样过 2 mm 筛后,4℃保存,准备进行酶活性测定及相关 Biolog 检测,并留下部分土样,阴干、研磨后用于土壤元素含量的测定。

1.2 土壤硫元素含量的测定

土壤硫元素的含量委托南京大学现代分析中心测定。采用 Foss Heraeus CHN-O-Rapid 仪器(Foss Heraeus Co., Ltd.)进行分析^[13]。

1.3 土壤芳基硫酸酯酶活性的测定

参考 Tabatabai^[14]的方法进行测定,活性以每小时每千克土样释放的 p-NP 的毫克数表示。

1.4 土壤微生物群落功能多样性的测定

称取 5 g 根际新鲜土样,加入到装有 50 mL 冰浴

无菌的 0.1 mol·L⁻¹ 磷酸缓冲溶液(K₂HPO₄/KH₂PO₄, pH7.0)且高压灭菌过的 50 mL 三角锥瓶中,封口后立即反复冰浴;置摇床上高速振荡 1 min,冰浴 1 min,重复 3 次,得 1:10 的提取液;静置 5 min 后,取出上清液 5 mL 加入灭过菌的 50 mL 三角锥瓶中,加入 45 mL 无菌 0.1 mol·L⁻¹ 磷酸缓冲溶液(pH 7.0),振荡,得到 1:100 的提取液;重复上一步骤,得 1:1000 的提取液,直至稀释到 Biolog 系统所要求的接种浓度[每毫升提取液中有 (3~4)×10⁴ 个微生物]。

将 Biolog GN/GP/FF/ECO 微平板从冰箱内取出,预热至 25 ℃;以 200 μL 多通道移液器取土壤微生物提取液到 Biolog 板中,每孔加 125 μL;将加过样的 Biolog 板在 30 ℃ 黑暗条件下温育 168 h;温育过程中,每隔 6 h 使用酶标仪在 590 nm 波长处读数,以测定每个微孔的吸光度变化。

1.5 数据分析

Biolog 板的 ELISA 反应采用每孔颜色平均变化率(average well color development, AWCD)来作总体的描述,计算公式如下:

GN、GP、FF 板: $AWCD = [\sum (C - R)] / 95$

ECO 板: $AWCD = [\sum (C - R)] / 31$

式中: C 为所测反应孔的光吸收值; R 为对照孔 A1 的光吸收值^[8]。

各板 AWCD 值分别反映 Biolog 微平板上供试土壤样品中革兰氏阴性细菌群落、革兰氏阳性细菌群落、真菌群落和总体微生物群落的活性。

根据碳源利用种类和利用数量的差异,引用了多个多样性指数对微生物群落的功能多样性进行定量,多样性指数的计算方法和群落多样性的用途如表 1 所示^[15]。Biolog 微平板的各个指数的计算通过利用 Visual Basic 编写 Excel 宏程序实现。

利用 SAS 8.2 对上述所有试验数据进行方差分析、多重比较和 LSD 检验。当 P<0.05 时表示差异显

著,当 P<0.01 时表示差异极显著。

2 结果与分析

2.1 根际箱种植 2 组转基因大豆对土壤硫元素含量的影响

在 A 组转基因大豆品系 OE-8 和 RNAi-3 花期根际土壤中,与其受体相比,硫元素含量显著降低,说明 A 组 OE-8 和 RNAi-3 品系到花期时,其根系对根际土壤中硫元素的吸收较其受体更强,导致根际土壤中硫元素含量下降;B 组转基因大豆品系与其受体相比,到花期时,唯转基因大豆品系 57 的根际土壤中硫元素含量显著升高,分析认为,B 组这类富含硫氨基酸的转基因大豆品系于根际箱中种植后,品系 17-4 和 21-8 的根系从根际土壤中富积硫元素的活跃生理活动较为滞后,而品系 57 到花期时,可能因其根系代谢旺盛而向环境分泌含硫物质,导致根际土壤中硫元素含量反而显著提高(图 1)。

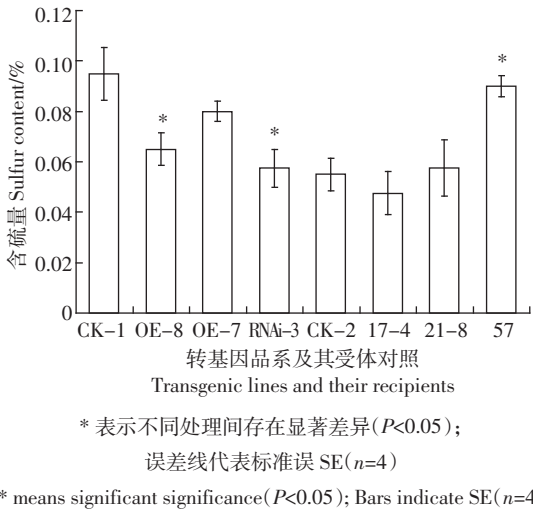


图 1 2 组转基因大豆及其受体花期根际土壤样品中硫元素含量
Figure 1 The content of sulfur in rhizospheric soils of 2 transgenic soybean groups and their recipients at the florescence stage

表 1 土壤微生物群落功能多样性指数公式

Table 1 Indices for functional diversity of soil microbial community

多样性指数 Diversity index	用途 Function	公式 Formulas	备注 Notes
Shannon 指数 Shannon index	评估丰富度和均度 Reflecting richness and evenness	$H' = -\sum p_i \ln p_i$	p_i 为第 i 孔相对吸光值 $(C-R)$ 与整个平板相对吸光值总和的比率 $p_i = n_i / \sum n_i, n_i = C_i - R$. C_i is OD for the i -th well with C source and R is that for the control well without C source.
Shannon 均匀度指数 Shannon evenness	通过 Shannon 指数计算出的均度 Evenness calculated from Shannon index	$SE = H' / \ln S$	S 为颜色变化的孔的数目 S is the total number of positive wells in each plate.
McIntosh 指数 McIntosh index	基于群落物种多维空间上的 Euclidean 距离的多样性指数 Giving a high degree of discrimination between based on Euclidean distance	$U = \sqrt{\sum n_i^2}$	n_i 是第 i 孔的相对吸光值 $(C-R) n_i = C_i - R$. C_i is OD for the i -th well with C source and R is that for the control well without C source.

2.2 根际箱种植 2 组转基因大豆对土壤芳基硫酸酯酶活性的影响

本试验测定了大豆生长代谢最旺盛的花期土壤样品芳基硫酸酯酶的活性。虽然在花期,A 组品系 OE-8 和 RNAi-3 根际土壤硫元素含量, 与其受体相比有显著降低,B 组转基因大豆品系 57 根际土壤中硫元素含量显著提高, 但根际箱中种植转基因大豆之后,A 组和 B 组组内品种对比结果显示, 根际土样芳基硫酸酯酶活性差异均不显著(图 2)。

2.3 根际箱种植 2 组转基因大豆对土壤微生物群落活性的影响

土壤微生物群落 AWCD 的变化特征反映了其代谢碳源的整体情况。如图 3 所示, 4 种 Biolog 板上所显示的土壤微生物群落代谢活性的变化趋势均随着温育时间的延长而增加, 但 2 组转基因大豆对土壤微生物群落代谢活性的影响则不尽相同。虽然供试的 2 组转基因大豆根际土壤和对照相比, 在总体微生物群落活性上没有显著差异, 但 A 组中, 自温育 96 h 起, 转基因品系 RNAi-3 的真菌活性显著降低, 到 168 h 的时候, 真菌活性差异达极显著, 而 B 组中转基因大

豆制品系和对照相比, 根际土壤真菌活性没有显著差异。A 组转基因大豆品系根际土壤的革兰氏阴性菌活性显著低于其对照, 而 B 组 4 个大豆品系没有显著差异。A 组中, 只有转基因品系 RNAi-3 的革兰氏阳性菌活性显著降低, B 组转基因品系 21-8 的革兰氏阳性菌活性显著高于其受体及其他转基因品系。可见, 品系 RNAi-3 的根际箱种植遏制了根际土壤革兰氏阴性菌、革兰氏阳性菌及真菌的生理生化活动, 品系 21-8 的根际箱种植导致了根际土壤革兰氏阳性菌生理生化活动的加强。

上述结果表明, 转基因大豆对土壤微生物群落代谢活性的影响受受体品种基因型的调控。而转基因大豆作用于土壤微生物代谢活性的方式则与影响土壤革兰氏阴性和阳性菌群落的代谢活性有关。

2.4 根际箱种植 2 组转基因大豆对土壤微生物群落功能多样性的影响

如表 2 所示, 对于 A 组, 在 Biolog ECO 板、Biolog GN 板以及 Biolog FF 板上, 品系 RNAi-3 根际土壤中总体微生物群落、革兰氏阴性菌和真菌群落的 Shannon 指数均较对照显著降低, 品系 OE-7 根际土壤中革兰氏阴性菌和真菌群落的 Shannon 指数也显著低于对照; 在 Biolog GN 板以及 Biolog FF 板上, 品系 RNAi-3 根际土壤中革兰氏阴性菌和真菌群落的 Shannon 均匀度指数显著低于对照, Biolog ECO 板上所有转基因品系的 Shannon 均匀度指数也显著降低; 不管是 Biolog ECO 板还是 Biolog GN 板上, 转基因品系根际土壤微生物群落的 McIntosh 指数与对照差异均不显著。然而在 Biolog GP 板及 Biolog FF 板上, 品系 RNAi-3 根际土壤中革兰氏阳性菌和真菌群落的 McIntosh 指数均较对照显著降低。

如表 3 所示, 对于 B 组, 在 Biolog FF 板上, 转基因品系 17-4 和 57 根际土壤真菌群落的 Shannon 指数较对照和品系 21-8 显著下降; 在 Biolog GN 板上, 转基因品系 17-4 和 57 根际土壤革兰氏阴性菌的 Shannon 均匀度指数、McIntosh 指数也较对照和品系 21-8 显著降低。

3 讨论

硫元素是构成含硫氨基酸(如甲硫氨酸、半胱氨酸及胱氨酸)和蛋白质的基本元素, 是合成作物体内其他生命活性物质的重要成分, 以各种方式参与作物的新陈代谢^[6]。土壤中硫元素大部分以有机态形式存在, 芳基硫酸酯酶催化有机物硫酸酯类的水解, 属于

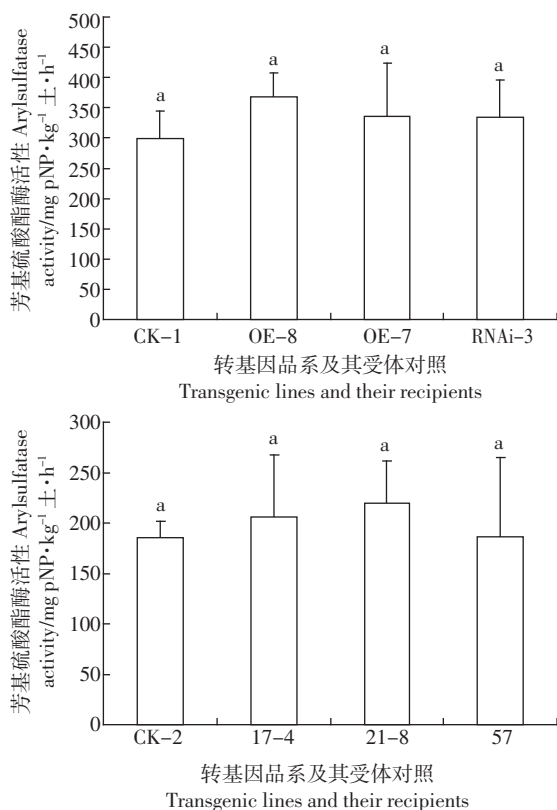
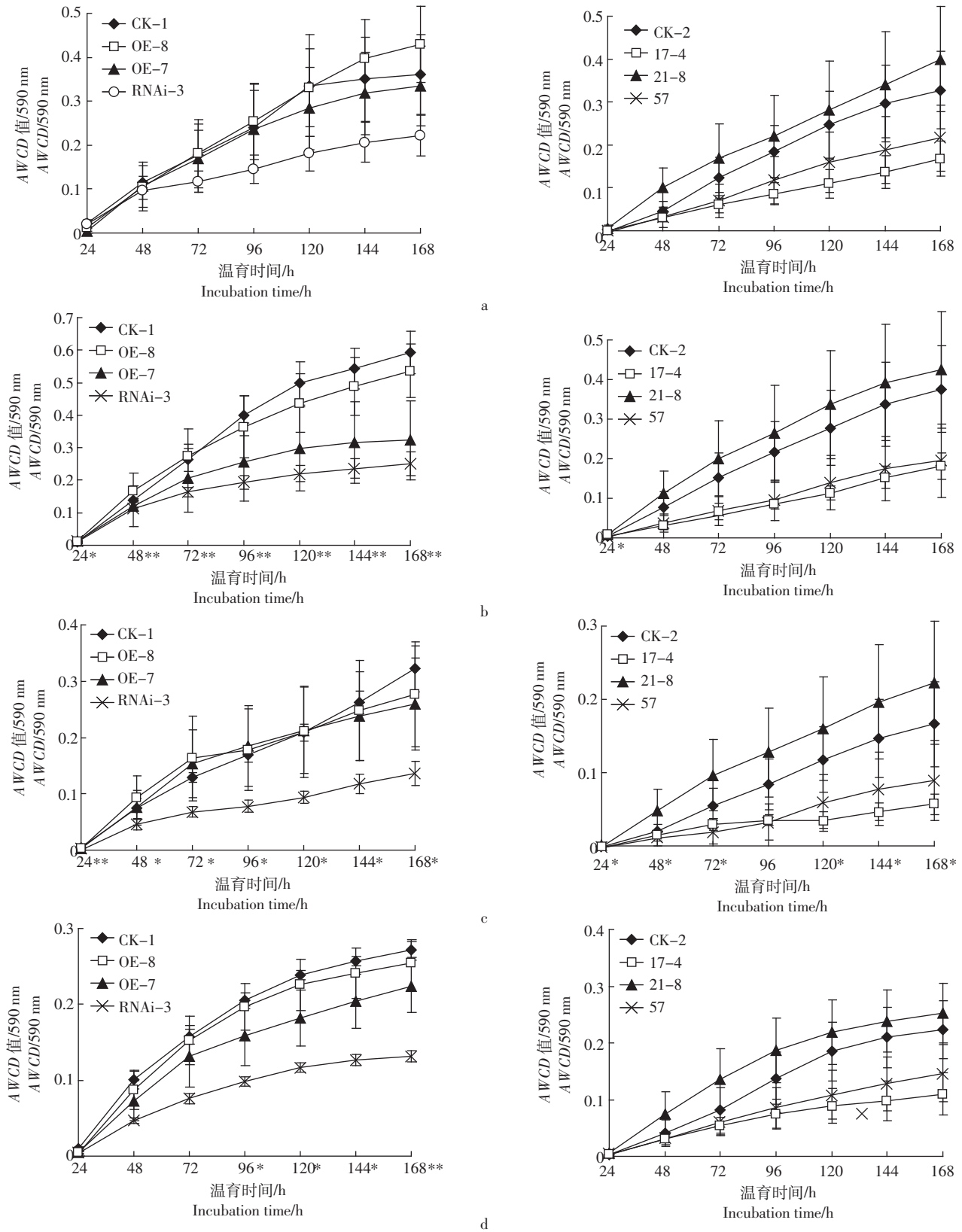


图 2 2 组转基因大豆及其受体花期根际土壤样品中芳基硫酸酯酶活性

Figure 2 Arylsulfatase activity in rhizospheric soils of two transgenic soybean groups and their recipients at the florescence stage



a:ECO 板;b:GN 板;c:GP 板;d:FF 板。 ** 表示极显著差异($P<0.01$), * 表示显著差异($P<0.05$);误差线代表标准误 SE($n=4$)

a:ECO plate; b:GN plate; c:GP plate; d:FF plate. ** means significant significance($P<0.01$), * means significance($P<0.05$); Bars indicate SE($n=4$)

图 3 2 组转基因大豆及其受体花期根际土壤样品 Biolog 板上 $AWCD$ 值随温育时间延长而变化的曲线

Figure 3 $AWCD$ values in BIOLOG plates of rhizospheric soils of two transgenic soybean groups and their recipients at the florescence stage

表 2 A 组转基因大豆及其受体花期根际土样基于 Biolog 板温育 168 h 时 *A WCD* 值的多样性指数
Table 2 Diversity and evenness indices of microbial communities in rhizospheric soils of Group A transgenic soybeans and their recipient at the florescence stage based on Biolog *A WCD* values at 168 h incubation

Biolog	转基因大豆及其受体 Transgenic soybeans and their recipient	平均值(标准误)Means(SE)		
		Shannon 指数 Shannon Index	Shannon 均匀度 Shannon Evenness	McIntosh 指数 McIntosh Index
ECO 板	CK-1	2.843(0.089)a	0.987(0.064)a	3.347(0.315)
	OE-8	2.669(0.125)a	0.834(0.029)b	3.595(0.552)
ECO plate	OE-7	2.433(0.189)ab	0.836(0.055)b	3.126(0.618)
	RNAi-3	2.046(0.237)b	0.755(0.035)b	2.589(0.289)
GN 板	CK-1	4.083(0.079)a	0.923(0.011)a	7.641(0.485)
	OE-8	3.972(0.104)a	0.906(0.016)a	7.228(0.714)
GN plate	OE-7	3.494(0.243)b	0.840(0.046)ab	5.277(1.231)
	RNAi-3	3.361(0.158)b	0.804(0.025)b	4.744(0.285)
GP 板	CK-1	3.829(0.116)	0.890(0.029)	5.143(0.460)a
	OE-8	3.441(0.251)	0.818(0.047)	4.908(1.077)a
GP plate	OE-7	3.286(0.209)	0.789(0.031)	4.962(0.990)a
	RNAi-3	3.010(0.161)	0.772(0.028)	3.339(0.299)b
FF 板	CK-1	4.187(0.083)a	0.954(0.024)a	3.612(0.075)a
	OE-8	4.105(0.078)a	0.922(0.012)a	3.344(0.228)a
FF plate	OE-7	3.890(0.127)b	0.874(0.026)ab	3.256(0.296)a
	RNAi-3	3.643(0.054)c	0.856(0.011)b	2.317(0.060)b

注:每一微平板每一纵栏中不同的字母表示样品间存在显著差异($P<0.05$)。括号内代表标准误 $SE(n=4)$ 。下表同。
Note: For each of Eco, GN, GP and FF plates, means followed by the different lower letters in the same column indicate significant differences ($P<0.05$) among different soils. ()= Standard error (n=4). The same below.

表 3 B 组转基因大豆及其受体花期根际土样基于 Biolog 板温育 168 h 时 *A WCD* 值的多样性指数
Table 3 Diversity and evenness indices of microbial communities in rhizospheric soils of Group B transgenic soybeans and their recipient at the florescence stage based on Biolog *A WCD* values at 168 h incubation

Biolog	转基因大豆及其受体 Transgenic soybeans and their recipient	平均值(标准误)Means(SE)		
		Shannon 指数 Shannon Index	Shannon 均匀度 Shannon Evenness	McIntosh 指数 McIntosh Index
ECO 板	CK-2	2.299(0.252)	0.078(0.057)	3.252(0.398)
	17-4	2.066(0.252)	0.709(0.062)	2.011(0.335)
ECO plant	21-8	2.612(0.226)	0.800(0.051)	3.322(0.669)
	57	1.953(0.233)	0.723(0.028)	2.604(0.470)
GN 板	CK-2	3.600(0.210)	0.880(0.017)a	5.957(1.000)a
	17-4	3.109(0.148)	0.743(0.025)b	4.050(0.385)b
GN plate	21-8	3.708(0.282)	0.887(0.035)a	6.026(1.273)a
	57	3.024(0.348)	0.773(0.054)b	3.816(1.005)b
GP 板	CK-2	3.211(0.366)	0.780(0.057)	3.315(0.686)
	17-4	3.023(0.540)	0.817(0.165)	2.120(0.271)
GP plate	21-8	3.497(0.198)	0.838(0.025)	3.958(0.991)
	57	2.924(0.435)	0.732(0.093)	1.980(0.783)
FF 板	CK-2	3.958(0.187)a	0.921(0.044)	3.227(0.435)
	17-4	3.558(0.243)b	0.871(0.060)	2.052(0.402)
FF plate	21-8	4.024(0.129)a	0.910(0.024)	3.362(0.452)
	57	3.577(0.194)b	0.834(0.031)	2.4907(0.440)

土壤硫循环的关键酶。有机硫类在芳基硫酸酯酶的作用下被无机化,转变为植物可利用的形态。所以,土壤芳基硫酸酯酶的活性直接影响着土壤中硫的有效性。大豆是我国目前主要的缺硫作物之一,土壤硫元素缺失,会增加土壤硝化作用,并且增加 NO_3^- 的淋溶损失,从而导致大豆减产^[17]。花期是作物生长的旺盛时期,作物已实现从营养生长向生殖生长的转变。本研究发现,种植转基因大豆会导致土壤硫元素显著下降,结

合根际土样芳基硫酸酯酶活性差异均不显著的结果分析认为,在植株到达花期阶段前,A组转基因大豆品系根际土壤中以无机形态存在的硫元素比重显著高于其受体,且这类硫元素很多已被转基因大豆根系较好地吸收,导致到花期时,转基因大豆根际土壤中有待芳基硫酸酯酶矿化的有机硫比重下降。由此似乎可以推论,A组中3个富含S氨基酸的转基因大豆品系在花期阶段前可能就已经进行着活跃的富积硫元素(即从外界环境中同化硫元素转化为自身物质)的生理活动。因此,种植这2个转基因大豆品系(尤其是A组),在生长到达花期前要注意无机硫肥的补充,以改善土壤与作物间硫元素循环的平衡。

通过不同 Biolog 板的试验结果,即总体微生物、革兰氏阴性菌、革兰氏阳性菌和真菌群落 *AWCD* 值的动态变化,就能分别研究根际箱种植转基因大豆之后土壤微生物各种群落功能多样性的变化。图3结果表明,A组的RNAi-3品系根际土壤微生物群落活性显著低于其对照。且对表2结果的分析也表明,品系RNAi-3根际土壤微生物群落的丰富度、多样性和均度都显著低于其对照,品系OE-7根际土壤微生物群落的丰富度和均度显著低于其对照;B组的品系57和17-4根际土壤微生物群落的丰富度、多样性和均度也都显著低于其对照。此结论和花期根际土壤微生物群落结构主成分分析结果,即土壤微生物群落变化较大的转基因大豆品系有OE-7,RNAi-3,17-4和57较为一致^[18]。本研究认为,转基因大豆对土壤微生物群落代谢活性的影响除了受受体品种基因型的调控外,转基因品系的育成途径不一,如A组品系主要通过内源基因CG-3的过表达育成,而B组品系则通过外源调节基因 *gaga1* 的导入育成,也会引起对组间花期根际土壤微生物功能多样性的影响差异显著性不同;而在组内,可能是由于内源基因过表达方式、程度不一,或外源基因插入的位点不同,导致对同组内花期根际土壤微生物功能多样性的影响差异显著性不同。尤其是A组的RNAi-3品系,相对于其受体,根际土壤微生物群落活性显著降低,微生物功能多样性也显著下降。这可能是由于RNAi-3育成途径具一定的特殊性,即通过RNAi介导大豆 β -伴大豆球蛋白(7S)基因表达降低,而引起大豆球蛋白(11S)的GY2和GY5基因表达量增加,最终实现富含S氨基酸的增加^[5]。

虽然4种微平板反应孔中的含碳底物主要为糖类、羧酸类、氨基酸类、聚合物等有机化合物,但由于

考察的微生物对象不同,它们所占反应孔的比例也不相同,如糖类在FF板上反应孔所占比例达46%,在ECO板上仅占25.8%。GP板和FF板上反应孔中还出现了较高比例的芳香族化合物。某种程度上,不同类型的底物以及不同比例的同类型底物从功能上选择了微生物群落;微生物群落也会调整代谢途径以便更好地利用各类底物。因此,根际箱中种植的转基因大豆品系,选择性地影响着根际土壤可培养微生物群落的结构,不同程度地改变了碳源底物的利用模式,促进了根际土壤可培养微生物群落的多样性、丰富度和均度差异的产生,因而品系RNAi-3、OE-7、17-4和57根际土壤可培养微生物群落的功能多样性指数与其对照相比,差异较大。

2012年陈丰等^[19]报道,利用Biolog ECO/GN/GP/FF系统分析了在大田种植条件下,相同2组转基因大豆品系对根际土壤有机元素含量和微生物群落多样性的影响,结果表明,A组中3个转基因大豆株系根际土壤革兰氏阴性菌、革兰氏阳性菌的McIntosh指数均显著低于对照,转基因品系OE-8根际土壤真菌的McIntosh指数也极显著低于对照。本研究表明,2种植方式下A组转基因大豆品系根际土壤革兰氏阳性菌群落的多样性显著降低(与大田种植不同,根际箱种植的这种显著降低只出现在RNAi-3根际土壤中)。这说明,无论是根际箱种植还是大田种植,对供试2组转基因大豆品系花期根际土壤微生物群落功能多样性影响的结果差异性不大。本试验在根际箱种植条件下进行研究,更准确地限定了根际土壤取样的范围,更有效地保持了取样位点的一致性,也更好地控制了对根际微环境的外来影响。

据此我们认为,富含S氨基酸转基因大豆根系对土壤硫元素的富集,某种程度上降低了土壤微生物(如RNAi-3根际土壤中的革兰氏阳性菌)的活性,但也有可能又促进了土壤中与硫循环关联的微生物的代谢活性。2个因素互作的结果,形成了2组转基因大豆根际土壤微生物活性与对照间的差异。本研究中转基因大豆对土壤微生物群落功能多样性的作用可能是借助外源基因表达产物进入根际微环境^[20]和调节土壤元素结构^[21]这2种因素综合进行的。

4 结论

(1)A组转基因品系OE-8和RNAi-3,花期根系对根际土壤中硫元素的吸收较其受体更强,导致根际土壤中硫元素含量下降;B组中唯转基因品系

Gaga1 57 花期的根际土壤中硫元素含量显著高于受体,这可能是因为其根系代谢旺盛而向环境分泌含硫物质。

(2)根际箱种植转基因大豆后,2组组内结果对比显示,花期根际土样芳基硫酸酯酶活性无显著差异。

(3)Biolog 微平板法结果显示,转基因大豆对土壤微生物群落代谢活性的影响受受体品种基因型的调控,与影响土壤中革兰氏阴性菌群落和革兰氏阳性菌群落的代谢活性有关。

(4)基于 Biolog 测定的多样性指数分析可知,对组间花期根际土壤微生物功能多样性的影响差异显著性不同,可能与转基因品系的育成途径不一有关;对同组内花期根际土壤微生物功能多样性的影响差异显著性不同,可能与内源基因过表达方式、程度不一,或外源基因插入的位点不同有关。

参考文献:

- [1] Kowalchuk G A, Bruinsma M, van Veen J A. Assessing responses of soil microorganisms to GM plants[J]. *TRENDS in Ecology and Evolution*, 2003, 18(8):403-410.
- [2] Icoz I, Stotzy G. Fate and effects of insect-resistant *Bt* crops in soil ecosystems[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2008, 40(3):559-586.
- [3] 龚明,王进. 甲胺磷影响下土壤微生物群落结构的动态平衡[J]. 南京林业大学学报:自然科学版, 2011, 35(3):6-10.
GONG Ming, WANG Jin. The dynamic equilibrium soil microbial community structure affected by methamidophos[J]. *Journal of Nanjing Forestry University (Natural Sciences Edition)*, 2011, 35(3):6-10.
- [4] El-Shemy H A, Khalafalla M M, Fujita K, et al. Improvement of protein quality in transgenic soybean plants[J]. *Biologia Plantarum*, 2007, 51(2):277-284.
- [5] 易新萍. 应用 RNAi 研究大豆 β -伴大豆球蛋白基因的表达与调控[D]. 南京:南京农业大学, 2006.
YI Xin-ping. Application of RNAi studies the modulation and expression of β -coglycinin subunit gene in soybean[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2006.
- [6] 孙英. 转 gaga1 基因大豆的培育及初步鉴定[D]. 南京:南京农业大学, 2003.
SUN Ying. Culture and preliminary detection of soybean with floral regulatory gene gaga1[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2003.
- [7] 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.
- [8] 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]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1991, 57(8):2351-2359.
- [9] Malosso E, English L, Hopkins D W, et al. Community level physiological profile response to plant residue additions in Antarctic soils[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 2005, 42(1):60-65.
- [10] Xue D, Yao H Y, Ge D Y, et al. Soil microbial community structure in diverse land use systems: A comparative study using Biolog, DGGE, and PLFA analyses[J]. *Pedosphere*, 2008, 18(5):653-663.
- [11] Zhang C B, Wang J, Qian B Y, et al. Effects of the invader *Solidago canadensis* on soil properties[J]. *Applied Soil Ecology*, 2009, 43(2/3):163-169.
- [12] Li Y L, Fan X R, Shen Q R. The relationship between rhizosphere nitrification and nitrogen-use efficiency in rice plants[J]. *Plant, Cell & Environment*, 2008, 31(1):73-85.
- [13] de Abreu C A, de Abreu M F, van Raij B, et al. Extraction of boron from soil by microwave heating for ICP-AES determination[J]. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 1994, 25(19):3321-3333.
- [14] Tabatabai M A. Soil enzymes[M]//Weaver R W, Angel J S, Bottomley P S. Methods of soil analysis Part 2: Microbiological and biochemical properties. Madison: Soil Science Society of America, 1994:775-833.
- [15] Magurran A E. Ecological diversity and its measurement[M]. Princeton: Princeton University Press, 1988.
- [16] Moreau J W, Zierenberg R A, Banfield J F. Diversity of dissimilatory sulfite reductase genes(*dsrAB*) in a salt marsh impacted by long-term acid mine drainage[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76(14):4819-4828.
- [17] Stevenson F J, Cole M A. Cycles of soil: Carbon, nitrogen, phosphorus, sulfur, micronutrients[M]. New York: John Wiley & Sons Inc., 1999.
- [18] 刘根林,桂恒,彭欣,等. 根际箱种植条件下富含硫氨基酸转基因大豆对土壤微生物群落结构的影响[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(2):288-291.
LIU Gen-lin, GUI Heng, PENG Xin, et al. Effects of sulfur amino acids-rich transgenic soybeans planted in rhizobox on soil microbial community structure[J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2013, 41(2):288-291.
- [19] 陈丰,彭欣,华小梅,等. 富含 S 氨基酸转基因大豆对根际土壤有机元素含量和微生物群落多样性的影响[J]. 大豆科学, 2012, 31(2):259-265.
CHEN Feng, PENG Xin, HUA Xiao-mei, et al. Effects of sulfur amino acids-rich transgenic soybeans on soil organic elements and microbial community diversity[J]. *Soybean Science*, 2012, 31(2):259-265.
- [20] Palm C J, Seidler R J, Schaller D L, et al. Persistence in soil of transgenic plant-produced *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* δ -endotoxin[J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 1996, 42(12):1258-1262.
- [21] 俞元春,冷春龙,舒洪岚,等. 转基因抗虫棉对土壤养分和酶活性的影响[J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 2011, 35(5):21-24.
YU Yuan-chun, LENG Chun-long, SHU Hong-lan, et al. Effects of insect-resistant transgenic cotton on soil nutrients and enzyme activities[J]. *Journal of Nanjing Forestry University(Natural Sciences Edition)*, 2011, 35(5):21-24.