

转菜豆几丁质酶基因和烟草葡聚糖酶基因抗病棉花的种植对棉花根际土壤酶活性的影响

吴名付^{1,2}, 祝建波^{1,2}, 王爱英^{1,2*}

(1.石河子大学生命科学学院, 新疆 石河子 832000; 2.石河子大学农业生物技术重点实验室, 新疆 石河子 832000)

摘要:本研究探讨了转菜豆几丁质酶基因和烟草葡聚糖酶基因的抗病棉花株系 7p、28p(双价载体)以及受体高代材料 97185、79701 的种植对根际土壤过氧化氢酶活性、蛋白酶活性、纤维素酶活性、脲酶活性、蔗糖酶活性的影响。结果表明:整个生育时期抗病转基因棉花根际土壤的过氧化氢酶活性与其受体之间差异不显著($P>0.05$)。另外,根际土壤的蛋白酶活性、纤维素酶活性、脲酶活性、蔗糖酶活性在同一生育期内差异不显著($P>0.05$),而在不同的生育时期差异显著($P<0.05$)。说明抗病转基因棉花的种植对根际土壤过氧化氢酶和蛋白酶几乎无影响,而根际土壤纤维素酶、脲酶、蔗糖酶活性的变化转基因抗病棉花与受体种植之间几乎没有影响,而在不同棉花株系和生育期之间产生一定的影响,这可能与不同基因类型以及生育期植株根分泌物有关。研究初步表明转基因抗病棉花的种植对土壤微生态的影响不大。

关键词:转基因抗病棉花;根际土壤酶活性;微生态

中图分类号:S154.2 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-2043(2012)06-1160-05

Effect of Planting Disease-resistant Transgenic Cotton on Rhizosphere Soil Enzymatic Activities

WU Ming-fu^{1,2}, ZHU Jian-bo^{1,2}, WANG Ai-ying^{1,2*}

(1.College of Life Science, Shihezi University, Shihezi 832000, China; 2.Key Laboratory of Agricultural Biotechnology Shihezi University, Shihezi 832000, China)

Abstract: The security of transgenic crops has been a focus problem. Study of transgenic plants on soil enzyme activities has important practical value for the scientific evaluation of transgenic crops potential risk. We taken a field experiment by planting disease-resistant transgenic cotton 7p, 28p (carry bean chitinase gene and tobacco glucanase binary vector) to study the influence of rhizosphere soil catalase activity, protease activity, cellulase activity, urease activity and saccharase activity. The result showed the planting of disease-resistant transgenic cotton had little effect on rhizosphere soil catalase, while these changed include the rhizosphere soil protease, cellulase, urease, invertase activity were closely related to genotype and growing stage. Preliminary inferred, transgenic disease-resistant cotton planting was relatively small on soil microecological impact. Thereby, our study would enrich the content of security assessment about disease-resistant transgenic cotton, but influence of microbial diversity remained to be studied for comprehensive evaluation.

Keywords: disease-resistant transgenic cotton; activity of rhizosphere soil enzymes; microorganism

新疆是我国棉花的主产区,棉花枯、黄萎病严重影响着棉花的产量与品质。转菜豆几丁质酶基因和烟草葡聚糖酶基因抗病棉花的种植能够大大提高棉花的抗病能力。近年来,随着转基因作物的大面积释放,

其对农业生态环境的影响备受关注^[1]。

转基因植物尽管存在着潜在的应用前景,但是也引起了人们对其安全性(包括生态安全)的高度关注。近来转基因植物对土壤生态系统的影响成为转基因植物安全性评价的焦点,相关报道也不断增多^[2-5,13]。对转基因棉花根际土壤酶活的研究现在主要集中在抗 Bt 棉,而对抗病转基因棉花对根际土壤酶活的影响研究较少,因此讨论抗病转基因棉花对土壤酶活的影响,对抗病转基因棉花的环境安全性释放具有实践

收稿日期:2011-09-16

基金项目:转基因生物新品种培育重大专项课题“转基因棉花环境安全评价技术”(2011ZX08011-002)

作者简介:吴名付(1985—),男,四川安岳人,在读硕士,研究方向为植物基因工程。E-mail:wuminfu315@sina.com

* 通讯作者:王爱英 E-mail:way-sh@126.com

和理论意义。

土壤酶活性是评价土壤肥力和土壤健康状况的重要指标,不仅反映了土壤生物化学反应的方向和强度,还部分反映了土壤生态功能,在土壤系统的物质和能量循环中起了关键性的作用^[6]。本实验旨在通过对抗病转基因棉花根际土壤的过氧化氢酶活性、蛋白酶活性、纤维素酶活性、脲酶活性、蔗糖酶活性进行测定,研究抗病转基因棉花种植是否对土壤酶活性产生影响,从而从土壤学角度来反映抗病转基因棉花的种植对土壤微生态的影响。

1 材料与方法

1.1 试验地点

新疆石河子气候属于温带大陆性气候,年降水量125.0~207.7 mm,全年平均气温在6.5℃。棉花枯黄萎病混生病圃位于石河子大学农学院试验站(44°18'N, 86°03'E),供试土壤为沙土,部分理化性状参数如下:有机质 39.3 g·kg⁻¹,速效氮 269.5 mg·kg⁻¹,速效磷 20 mg·kg⁻¹,速效钾 200 mg·kg⁻¹,pH7.67。大田试验场二连(44°18'N, 86°00'E),供试土壤为粘土,部分理化参数如下:有机质 50.9 g·kg⁻¹,速效氮 210 mg·kg⁻¹,速效磷 24 mg·kg⁻¹,速效钾 360 mg·kg⁻¹,pH7.94。

1.2 试验材料

实验材料转基因棉花7p是通过转基因受体材料97185转菜豆几丁质酶和烟草葡聚糖酶基因双价载体而来;转基因棉花28p是转基因受体材料79701转菜豆几丁质酶和烟草葡聚糖酶基因双价载体而来。转基因棉花7p和28p均由石河子大学农业生物技术重点实验室提供,其受体材料97185、79701为品质优良

的高代材料。

1.3 试验内容与方法

试验包括4个处理,小区随机区组设计,3个重复,每个小区面积30 m²,分别采取棉花的苗期、花期、铃期与吐絮期根际土壤,对角线法采样,每个重复小区采取的土样混合均匀,风干后过1 mm筛备用。土壤过氧化氢酶活性测定采用高锰酸钾滴定法^[7];土壤蛋白酶活性测定采用茚三酮比色法^[7];土壤纤维素酶活性测定采用3,5-二硝基水杨酸比色法^[7];土壤蔗糖酶活性测定采用3,5-二硝基水杨酸比色法^[7];土壤脲酶活性测定采用苯酚钠比色法^[7]。

1.4 数据处理与统计分析

数据处理采用SPSS13.0软件进行单因素方差分析,LSD法进行多重比较,Origin8.0进行作图。

2 试验结果与分析

2.1 转基因抗病棉花的种植对土壤过氧化氢酶活性的影响

从图1可以看出,大田种植的棉花根际土壤和病圃种植的棉花根际土壤的过氧化氢酶活性基本未发生变化;从整个生育期来看,转基因抗病棉花7p、28p与其受体97185、79701之间的根际土壤过氧化氢酶活性的差异不显著($P>0.05$)。

2.2 转基因抗病棉花的种植对棉花根际土壤蛋白酶活性的影响

从表1可以发现,大田种植转基因抗病棉花和非转基因受体对根际土壤蛋白酶活性的影响整个生育期差异显著($P<0.05$),而病圃转基因抗病棉花和非转基因受体的根际土壤蛋白酶活性在整个生育期差异

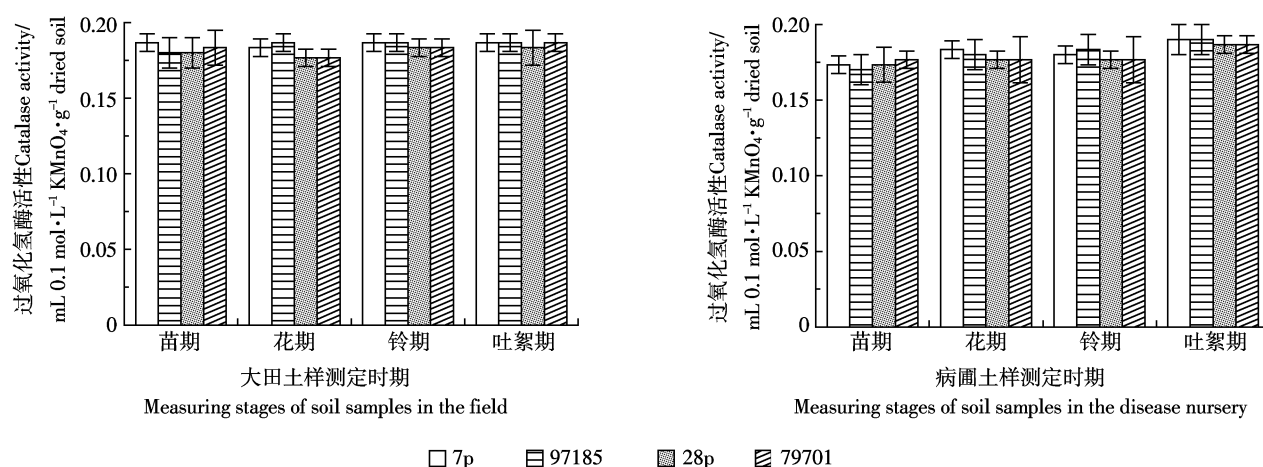


图1 大田、病圃转基因抗病棉花根际土壤过氧化氢酶活性的动态变化

Figure 1 The dynamic changes of rhizosphere soil catalase activity of disease resistant transgenic cotton in the field and the disease nursery

不显著($P>0.05$),基本上在 $5.5\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{ glycin}$ 左右变化。表明不同生育期之间转基因棉花的种植对土壤根际蛋白酶活性有差异,这与不同生育期内转基因棉花与受体棉花根分泌物差异有关。转基因棉花的种植在整个生育期对土壤根际蛋白酶活性大体上的影响较小,仅个别生育期内转基因植株与非转基因植株之间的蛋白酶活性出现较小差异。

2.3 转基因抗病棉花的种植对土壤根际纤维素酶活性的影响

土壤纤维素酶有助于腐殖质的形成和碳素养分的释放。纤维素的分解利用不仅对提高土壤肥力和增加作物产量具有十分重要的意义,而且也是自然界碳素循环的重要环节,它能水解纤维素中的 β -1,4-糖苷键^[10]。

图 2 表明,尽管不同株系之间以及不同生育阶段转基因棉花的种植对根际土壤纤维素酶活性的影响差异显著($P<0.05$)。但是同一生育期内种植于大田和病圃中,转基因抗病棉花与受体棉花的种植对根际土

壤纤维素酶活性差异不显著($P>0.05$)。

2.4 转基因抗病棉花的种植对根际土壤脲酶活性的影响

脲酶能够催化尿素水解成 CO_2 和 NH_3 ,脲酶活性的高低一定程度上反映了土壤供氮水平的状况^[11]。图 3 可以看出,不同株系以及不同生育阶段之间差异较显著($P<0.05$)。在同一生育期内,大田和病圃中种植转基因抗病棉花与其受体之间根际土壤脲酶活性差异不显著($P>0.05$)。

2.5 转基因抗病棉花的种植对根际土壤蔗糖酶活性的影响

土壤蔗糖酶是评价土壤中物质转化强度的酶类,它的活性不仅可以表征土壤生物学活性强度,也可作为评价土壤熟化程度和肥力水平的指标^[12]。由表 2 可知,不同生育期间存在显著差异($P<0.05$),不同棉花株系之间差异明显($P<0.05$)。同一生育期内,大田和病圃转基因抗病棉花种植与受体棉花相比,对根际土壤蔗糖酶活性的影响差异不显著($P>0.05$)。

表 1 转基因抗病棉花种植不同生育期对根际土壤蛋白酶活性的影响($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{ glycin}$)

Table 1 Disease resistance transgenic cotton at different growth stages on rhizosphere soil protease activity($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{ glycin}$)

项目	生育期	7p	97185	28p	79701
大田蛋白酶	苗期	5.75±0.013b	5.54±0.140bd	5.28±0.013g	5.34±0.035fg
	花期	5.77±0.034b	5.66±0.021bc	5.34±0.013fg	5.18±0.061h
	铃期	5.55±0.025d	5.45±0.018ed	5.80±0.035b	5.88±0.035ba
	吐絮期	5.78±0.016b	5.73±0.013bc	5.43±0.013e	5.39±0.061ef
病圃蛋白酶	苗期	5.43±0.013ef	5.53±0.023cd	5.45±0.026ef	5.35±0.033e
	花期	5.91±0.071a	5.89±0.013a	5.63±0.033b	5.57±0.024bc
	铃期	5.47±0.076de	5.40±0.087ef	5.41±0.013ef	5.54±0.016f
	吐絮期	5.52±0.072cd	5.38±0.013d	5.56±0.018c	5.56±0.013c

注:字母不同表明有差异($P<0.05$),下同。The different letters stand for difference $P<0.05$. The same below.

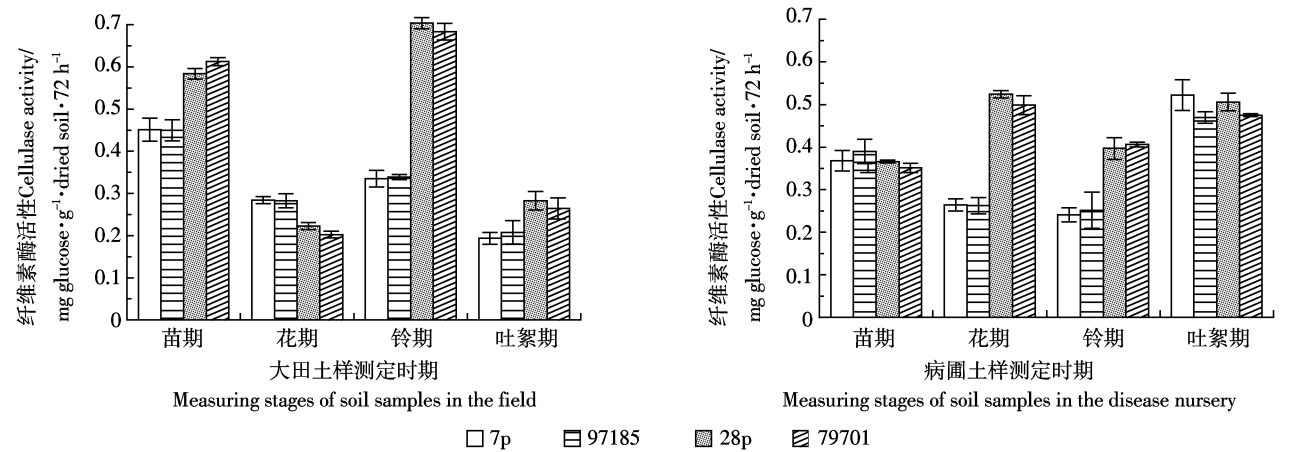


图 2 大田、病圃转基因抗病棉花根际土壤纤维素酶活性的动态变化

Figure 2 The dynamic changes of rhizosphere soil cellulase activity of disease resistant transgenic cotton in the field and the disease nursery

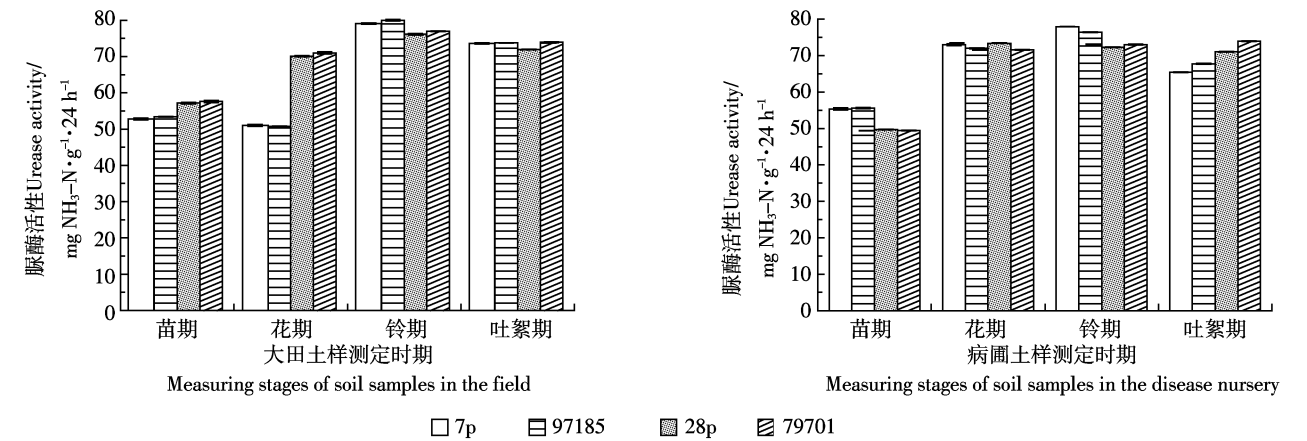


图 3 大田、病圃抗病转基因棉花根际土壤脲酶活性的动态变化

Figure 3 The dynamic changes of rhizosphere soil urease activity of disease resistant transgenic cotton in the field and the disease nursery

表 2 转基因抗病棉花种植不同生育期对根际土壤蔗糖酶活性的影响

Table 2 Disease resistance transgenic cotton at different growth stages on rhizosphere soil sucrase activity

项目	生育期	7p	97185	28p	79701
大田蔗糖酶	苗期	25.38±0.21h	25.02±0.16h	17.76±0.09g	18.27±0.02g
	花期	25.57±0.24d	25.83±0.09d	21.71±0.17f	21.74±0.22f
	铃期	27.01±0.02c	26.32±0.28bc	22.08±0.15e	23.19±0.02e
	吐絮期	29.23±0.09ab	29.46±0.07a	28.99±0.15c	29.04±0.15c
病圃蔗糖酶	苗期	23.36±0.11f	23.25±0.07g	25.34±0.09l	25.41±0.17kl
	花期	29.17±0.09ef	29.04±0.15e	27.26±0.09j	27.07±0.11j
	铃期	32.95±0.15c	33.37±0.26d	27.61±0.25hi	27.58±0.22h
	吐絮期	33.47±0.16ab	33.73±0.13a	32.93±0.13b	33.03±0.07b

3 讨论

土壤酶主要在土壤中以酶-无机矿质胶体复合体和酶-腐殖质复合体的形式出现，土壤酶活性与腐殖质含量密切相关^[15]。土壤酶在适宜的条件下，能加快土壤中某些重要生化反应的过程，如腐殖物质的合成和分解，以及各类有机物质的水解等^[14,16]。

土壤中普遍存在着土壤过氧化氢酶，它不仅能促进过氧化氢的分解，而且能有效阻止过氧化氢对生物体的伤害^[8]。土壤过氧化氢酶活性与土壤有机质含量有关，与微生物区系也有关系，一定程度上反映了土壤微生物过程的强度。本研究发现种植抗病转基因棉花及其受体棉花对根际土壤的过氧化氢酶活性在整个生育期差异不显著，可能与根际土壤微生物的分布和种群数量有关。蛋白酶能够促使蛋白质和肽水解成氨基酸，蛋白酶活性的高低在很大程度上反映了植物有效利用氮源的量^[9]。大田抗病转基因棉花与受体之间蛋白酶活性差异显著，而病圃差异不显著，可能与土壤微生物分布有关。根际土壤纤维素酶活性、脲酶

活性、蔗糖酶活性在抗病转基因棉花与其受体间在同一生育期酶活性差异不显著，这 3 种酶活性可能受棉花株系以及不同生育期的影响。孙彩霞等^[17]对种植转 Bt 基因水稻对土壤酶活性影响的研究表明，Bt 基因水稻的种植使得土壤脲酶活性发生了显著变化，这与本实验研究相吻合。而土壤蔗糖酶活性在测定过程中无显著改变则与本实验不一致，可能是因为微生物种群分布不均所致。

研究中相关土壤酶活性的变化可能与根际土壤微生物区系，植物残渣的分解作用、氨化作用、硝化作用以及相关酶的合成有关。转基因棉花对土壤酶的影响依棉花品种、生育期、土壤酶类型的不同而不同，可能是由于转基因棉花外源蛋白的表达以及根分泌的特性随生育期、品种等因素变化而变化的结果。通过抗病转基因棉花的种植对根际土壤酶活性影响的研究，丰富了抗病转基因棉花安全性评价的内容，但要全面地评价抗病转基因棉花对土壤生态系统的影响，还需要研究转基因棉花的种植对根际土壤微生物多样性的影响。

4 结论

转基因植物可以通过直接或间接方式影响土壤生态系统。转基因抗病棉花的种植对根际土壤过氧化氢酶的活性几乎没有影响,抗病转基因棉花的种植对根际土壤蛋白酶活性、蔗糖酶活性、脲酶活性、纤维素酶活性也几乎没有影响,与受体棉花之间没有差异,可能受棉花品种和生育期的影响,在不同生育期之间,产生了一定的影响。通过抗病转基因棉花的种植对根际土壤酶活性影响的研究,可以初步推断转菜豆几丁质酶基因和烟草葡聚糖酶基因抗病棉花的种植对土壤微生态代谢的影响不大。转基因抗病棉花的种植对土壤微生态几乎没有影响,可以初步推断转基因抗病棉花的种植对土壤生态是安全的。

参考文献:

- [1] Chen Zhang Liang, Gu Hongya, Li Yi, et al. Safety assessment for genetically modified sweet pepper and tomato[J]. *Toxicology*, 2002, 188: 297-307.
- [2] Khurram Bashir, Tayyab Husnain, Tahira Fatima, et al. Field evaluation and risk assessment of transgenic indica basmati rice[J]. *Molecular Breeding*, 2004, 13:301-312.
- [3] Gyamfi S, Pfeifer U, Stierschneider M, et al. Effects of transgenic glufosinate-tolerant oilseed rape (*Brassica napus*) and the associated herbicide application on eubacterial and *Pseudomonas* communities in the rhizosphere[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2002, 41(3):181-190.
- [4] Pirondini A, Marmiroli N. Environmental risk assessment in GMO analysis[J]. *Rivista Biologia*, 2008, 101(2):215-246.
- [5] Donegan K K, Palm C J, Fieland V J, et al. Changes in levels, species, and DNA fingerprints of soil microorganisms associated with cotton expressing the *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* endotoxin[J]. *Applied Soil Ecology*, 1995, 2(2):111-124.
- [6] 娜布其, 赵建宁, 杨殿林, 等. 转双价(Bt+CpTI)棉种植对土壤速效养分和酶活性的影响[J]. 农业环境科学学报, 2011, 30(5):930-937.
NA Bu-qi, ZHAO Jian-ning, YANG Dian-lin, et al. Effects of transgenic Bt + CpTI cotton planting on the soil available nutrients and enzyme activities[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2011, 30(5): 930-937.
- [7] 关松荫. 土壤酶及其研究法[M]. 北京:农业出版社, 1986.
GUAN Song-yin. Soil enzyme activity and research methods[M]. Beijing: Agricultural Press, 1986.
- [8] 贾继文, 聂俊华, 李絮花, 等. 蔬菜大棚土壤理化性状与土壤酶活性关系的研究[J]. 山东农业大学学报(自然科学版), 2001, 32(4):427-432.
JIA Ji-wen, NIE Jun-hua, LI Xu-hua, et al. Study on the relationship between the soil physical-chemical properties and soil enzymatic activity of plastic greenhouse[J]. *Journal of Shandong Agricultural University (Natural Science)*, 2001, 32(4):427-432.
- [9] 严昶升. 土壤肥力研究方法[M]. 北京:农业出版社, 1988.
YAN Chang-sheng. Research methods of soil fertility [M]. Beijing: Agricultural Press, 1988.
- [10] Thauer R K. Biochemistry of methanogenesis: A tribute to Marjory Stephenson[J]. *Microbiology*, 1998, 144:2377-2406.
- [11] Springer E, Sachs M S, Woese C R, et al. Partial gene sequence for the A subunit of methyl coenzyme M reductase (*mcrI*) as a phylogenetic tool for the family *Methanosarcinaceae*[J]. *International Journal of System Bacteriol*, 1995, 45:554-559.
- [12] Nannipieri P, Alef K. Methods in applied soil microbiology and biochemistry[M]. London: Academic Press, 1995:229-355.
- [13] Glandorff C M, Bakker P A H M, Van 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.
- [14] 万小羽, 梁永超, 李忠佩, 等. 种植转 Bt 基因抗虫棉对土壤生物学活性的影响[J]. 生态学报, 2007, 27(12):5414-5420.
WAN Xiao-yu, LIANG Yong-chao, LI Zhong-pe, et al. Effect of planting transgenic Bt cotton on soil enzymatic and microbial activities [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2007, 27(12):5414-5420.
- [15] Rao M A, Violante A, Gianfreda L. Interaction of acid phosphatase with clays, organic molecules and organic mineral complexes: Kinetics and stability[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2000, 32:1007-1014.
- [16] Busto M D, Perez-Mateos M. Extraction of humic- β -glucosidase fractions from soil[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 1995, 20:77-82.
- [17] 孙彩霞, 陈利军, 武志杰, 等. 种植转 Bt 基因水稻对土壤酶活性的影响[J]. 应用生态学报, 2003, 14(12):2261-2264.
SUN Cai-xia, CHEN Li-jun, WU Zhi-jie, et al. Effect of transgenic Bt rice planting on soil enzyme activities[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2003, 14(12):2261-2264.